

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-213775

(43)Date of publication of application : 24.08.1993

(51)Int.Cl. A61K 39/395

A61K 39/395

C07K 15/28

(21)Application number : 04-019968 (71)Applicant : OTSUKA
PHARMACEUT CO
LTD

(22)Date of filing : 05.02.1992 (72)Inventor : SUGIYAMA
YOSHIHIRO
KASHIWABARA
YOSHINORI
SHIBAMORI
MASAFUMI
DEGUCHI KYOHEI
IMAGAWA KENICHI
KIKUCHI MIKIO

(54) BFA ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a BFA antibody effective for treating cancers, especially malignant tumors such as human mammary cancer.

CONSTITUTION: A complex antibody wherein one antibody constituting the complex antibody is human c-erbB-2 specific antibody and the other is human lymphocyte antibody. Especially the complex antibody wherein an antibody recognizing surface antigen of target cell is anti-human c-erbB-2 antibody and an antibody which is bonded to an effector cell and transmits a signal is an anti-human lymphocyte antibody. A therapeutic agent for cancer comprising the complex antibody as an essential component.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.06.1993

[Date of sending the examiner's
decision of rejection] 13.02.1996

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The compound antibody characterized by for an antibody being a Homo sapiens c-erbB-2 singularity antibody, and another side being a Homo sapiens lymphocyte antibody while a compound antibody is constituted.

[Claim 2] The compound antibody according to claim 1 whose antibody which recognizes the surface antigen of a target cell is anti-Homo sapiens c-erbB-2 antibody and whose antibody which combines with an effector cell and performs signal transfer is an anti-Homo sapiens lymphocyte antibody.

[Claim 3] The compound antibody according to claim 1 or 2 whose anti-Homo sapiens c-erbB-2 antibody is GFD-OA-p 185-1.

[Claim 4] The compound antibody according to claim 1 or 2 whose anti-Homo sapiens lymphocyte antibody is an anti-CD-3 antibody.

[Claim 5] The compound antibody according to claim 1 or 2 which reacts to Homo sapiens c-erbB-2 related protein specifically.

[Claim 6] The cancer treatment agent characterized by using a compound antibody according to claim 3 as an indispensable component.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to a compound antibody effective in cancer treatment, a more detailed compound antibody effective in malignant tumor therapies, such as a Homo sapiens breast cancer, and a cancer treatment agent.

[0002]

[Description of the Prior Art] The former, In cancer immunotherapy A monoclonal antibody Antibody dependency cellularity cell trauma operation (ADCC;antibody-dependent cellular cytotoxicity) [Martin, J.S., et al., Blood, and 73, 1431-1439 (1989)] being certain -- it is -- complement dependency bacteriolysis (complement-dependent cytotoxicity) [Irie, R.F., et al., and Proc.Natl.Acad.U.S.A. -- 83 and 8649-8698 (1986)] The clinical trial was widely made by the based passive immunity. However, the monoclonal antibody which guides a cytotoxic immunoreaction with efficacy required for cancer treatment was exceptional. Clinical results, such as this, were what shows the limitation of research of the cancer treatment by the monoclonal antibody.

[0003] As a leading approach for conquering the trouble by the above-mentioned monoclonal antibody The attempt which is made to dissociate two kinds of different antibody molecules, recombines, and obtains a hybrid antibody should do. [Nisonoff, A.and M.M.Rivers, Arch.biochem.Biophys., 93, and 460] (1961) to which this is performed using the rabbit polyclonal antibody in ancient times This was actually widely known, after the production technique of a monoclonal antibody was developed. [Koehler, G.and C.Milstein, Nature, 256, and 495] (1975).

[0004] Many approaches of making combine chemically by each one half of these two kinds of monoclonal antibodies, and producing a hybrid antibody (monomer type) are reported, and, generally this etc. is F(ab')₂. The

molecule is produced as an ingredient. For example, BURENNAN and others (Brennan) does reduction processing of this F (ab') dyad using the reducing agent of DTT (dithiothreitol). By protecting the sulfhydryl group of one Fab' on a 5 and 5'-dithio screw (2-nitro benzoic acid) (DTNB), being referred to as Fab'-SNB, and mixing with Fab'-SH of another side By high yield, a monomer type hybrid antibody [Brennan and M. which have succeeded in producing, P. F.Davison and H.Pavlus, Science, 229, and 81-83 (1985); Nitta, T., et al., Eur.J.Immunol., 19, and 1437-1441 Reference (1989)].

[0005] moreover, as an option Two kinds of different antibody molecules by the cross linking agent SPDP [N-succinimidyl-3-(1-BIRIJIRU dithio) propionate] The approach [Staerz, U.D., et al., Nature, 314, and 628-631] (1985) of producing the hybrid antibody of the connected dimer type, Two kinds of antibodies F(ab')₂ Fragmentation is made the same. the approach [Nitta, T., et al., Eur.J.Immunol., 19, and 1437-1441] (1989) of producing the hybrid antibody of the dimer type combined using the cross linking agent SPDP etc. -- it is.

[0006] As another means to produce a hybrid antibody, there is a method of using a cell fusion method. For example, the antibody production hybridoma to a certain antigen is united with the splenic cells of the animal which carried out immunity with another antigen. approach [Milstein, C.and A.C.Cuello, Nature, 305, and 537] (1983) of obtaining a hybrid antibody production hybridoma and obtaining the target hybrid antibody by culture of this hybridoma Carry out the cell fusion of the different antibody production hybridoma mutually, and a hybrid antibody production hybridoma is obtained. From this a desired antibody Approach [Staerz and U.D.and to obtain M. J.Bevan, Proc.Natl.Acad.Sci, U.S.A., 83, and 1453 (1986); Lanzavecchia, A.and D.Scheidegger, Eur.J.Immunol., and 17, 105 (1987)] etc. -- it is.

[0007] Furthermore, as a hybrid antibody of another mold, it is the mouse hybridoma origin about the variant part (V) field which has antigen avidity, and what made the constant region (C) field which has immunity activity the thing of the Homo sapiens origin is known. Morrison (Morrison) in 1984 by whom the manufacture approach of this antibody was tried using gene modification technology others -- Various singularity [Morrison SL et al. and Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. as which the production approach of this seed hybrid antibody which it has is illustrated, 81, and 6851 (1984) : Sharon J.et al., Nature, and 309,364 (1984) : Neuberger, M.S., et al., Nature, 312, and 604 (1984) :], such as Boulianne, G.L., et al., Nature, 312, and 634 (1984).

Furthermore, it is [Jones and P.T. which can illustrate what considered only the complementarity determining region (CDR) of V field as the mouse origin (Reshaped antibody) as a hybrid antibody of a new mold, et al., Nature, 321, and 552. (1986) : Riechmann L., et al., Nature, 332, 323 (1988)].

[0008] Besides the cancer treatment described below, application of the

above-mentioned hybrid antibody is use [Suresh, M.R., et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 83, and 7989-7993 (1986)] in an immunoassay system. The use [Milsten, C. and A.C.Cuello, Nature, 305, and 537] (1983) by immunohistochemistry etc. is reported. Moreover, BFA with which one antibody of the hybrid antibody [compound antibody (it is hereafter called BFA; Bifunctional antibody for short) of two kinds of different antibodies which start in the form which progressed 1 step recognizes the antigen with which it met to be a cancer cell, and the antibody of this another side of BFA recognizes the T cell antigen of a T lymphocyte to be from the cancer treatment by the above-mentioned monoclonal antibody is producible.

***** and BFA combinable with the cancer cell made into a target can have cell trauma activity in this structure of BFA to a target cancer cell. The expectation for cancer treatment was made by this mechanism. Then, it sets to in vitro one. [Mezzanica and D., et al., and Int.J.Cancer, 41, and 609-615 (1988); Mansfield, P.F., and et al., [by which the activity of BFA was studied by some tumor cells] Cancer Immunol.Immunother, 33 and 247-254 (1991); Oshimi, K., et al., Blood, 77, and 1044-1049 (1991); Nitta, T., et al., E.J.Immunol., 19, and 1437-1441 (1989) --] .

[0009] Furthermore, [Nitta and T. by which clinical research of BFA was started also to neuroglioma, an ovarian cancer, and lung cancer, et al., Lancet, 335, and 368-371 (1990); de Leij, L., et al., Fondation Nationale de Transfusion Sanguine, Les Ulis France, 249-253] (1990).

[0010] On the other hand, relation by the growth factor receptor and oncogenesis in a cell has attracted attention by remarkable advance of cell biology in recent years. Especially as one of a number of oncogene products, the inside of acceptor mold tyrosine kinase (tyrosin residue specific protein kinase), It considers as the related oncogene which carries out the code of the protein very similar to an epidermal growth factor (epidermal growth factor; EGF) and this acceptor (receptor) of EGF. p185 gene which is the oncogene product of c-erbB-2 found-out gene [Yamamoto, T., et al., Nature, 319, and 230-234] (1986) In various Homo sapiens malignant tumors, the high manifestation of magnification of this gene and an oncogene product is accepted, and magnification of c-erbB-2 gene of high frequency is especially accepted into a breast cancer, gastric cancer, lung cancer, and a pancreatic cancer. About the adenocarcinoma, especially a breast cancer magnification of c-erbB-2 gene accepts to the cultured cell of a Homo sapiens breast cancer and the breast cancer origin -- having -- [King, C.R., et al., Science, 229, and 974-976 (1985); Yamamoto and T. -- et al., Nature, 319, 230-234 (1986)], [Slamon, D.J., et al., Science, 235, and 177-182] (1987) by which it is already found out that extent of magnification of this c-erbB-2 gene shows the prognosis of a breast cancer and strong correlation . However, the manifestation of this gene product is [Natali, P.G., et al., and Int.J.Cancer, 45,

and 457-461] (1990) which are not accepted rarely [pole] in a normal adult organization. .

[0011] The antibody and monoclonal antibody to the c-erbB-2 above-mentioned protein are also already developed. Only not only in a pathology ingredient Immediately an operation ingredient by the immunity staining technique The approach of inspecting is also being developed. [Masuko and T., et al., Jpn.J.Cancer Res., 80, and 10-14 (1989)]; Yamada, Y., et al., Jpn.J.Cancer Res., 80, and 1192-1198 (1989) --] The polyclonal antibody which recognizes the C terminal field of c-erbB-2 gene also as an antibody which recognizes c-erbB-2 gene product, for example, Polyclonal antibody Ab-1 [oncogene Science which recognizes pAb1 (T4881) [triton bioscience company make (Triton Bioscience Inc.;Alameda, CA)] and a kinase domain () [OncogeneScience] Inc.;Manhasset and NY] The monoclonal antibody which recognizes the extracellular domain of c-erbB -2, Two to 61 gamma SV [NICHIREN, Inc. (refer to JP,2-150293,A)] etc. is known. this invention persons previously An adenocarcinoma, It is produced by the hybridoma formed of fusion to the immunocyte of mammalian and the bone marrow cell of mammalian which carried out immunity by the culture supernatant of Homo sapiens cancer-cells-of-breast-carcinoma stock SK-BR -3 (ATCC deposition number; ATCC HTB30) in order to offer the diagnostic agent and therapy agent of a breast cancer especially. The anti-c-erbB-2 monoclonal antibody which reacts to c-erbB-2 related protein specifically, GFD-OA-p 185-1 was produced [Ouzge, Alper, et al., CellGrowth & Differentiation, 1, and 591-599] (1990). The 185 to GFD-OA-p1 above-mentioned antibody controlled intentionally Homo sapiens cancer cell stock SK-BR -3 which discovers c-erbB-2 gene, and in vitro growth of A-549 (Homo sapiens lung cancer cell strain; ATCC CCL185) (Japanese Patent Application No. No. 229835 [three to]). Although each above-mentioned antibody reacts with c-erbB-2 protein, respectively and is useful to a diagnosis of a breast cancer etc. also in the disease relevant to the manifestation of c-erbB-2 gene product, especially an adenocarcinoma (refer to JP,3-191865,A), as a therapy agent of the above-mentioned malignant tumor, these antibodies are monoclonal antibodies, as described above, and a good curative effect is not necessarily expected. In order to develop the immunity cure by BFA to the more general epithelial cancer, this invention persons develop BFA which makes a target the thing relevant to c-erbB-2 gene product, evaluate the antitumor activity of BFA in in vitro one, and came to complete this invention here.

[0012] in addition, it relates to c-erbB -2 -- it attaches BFA and is now -- there was no report, while constitutes BFA by this invention and it became possible to offer the compound antibody which an antibody turns into from anti-Homo sapiens c-erbB-2 antibody for the first time.

[0013]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Target cells, such as malignant tumor cells, such as a cell into which this invention discovers c-erbB-2 gene especially a breast cancer, lung cancer, gastric cancer, and a pancreatic cancer, cytotoxic T lymphocyte cell (Cytotoxic TLymphocytes) An effector cell can be combined specifically. etc. -- And it aims at offering clinical treatment agents, such as new BFA (compound antibody) which may reinforce the cell trauma activity over the above-mentioned target cell which the above-mentioned effector cell has by this, and a malignant tumor using this.

[0014]

[Means for Solving the Problem] According to this invention, while constitutes BFA (compound antibody) and an antibody is Homo sapiens c-erbB-2 antibody. BFA characterized by another side being a Homo sapiens lymphocyte antibody and the antibody which recognizes the surface antigen of a target cell especially are anti-Homo sapiens c-erbB-2 antibodies. The above BFA whose antibody which combines with an effector cell and performs signal transfer is an anti-Homo sapiens lymphocyte antibody, The above BFA to which the above BFA whose anti-Homo sapiens c-erbB-2 antibody is GDF-OA-p 185-1, and the above-mentioned anti-Homo sapiens lymphocyte antibody react to the Homo sapiens c-erbB-2 related protein which is an anti-CD-3 antibody specifically is offered. Moreover, according to this invention, the cancer treatment agent characterized by using Above BFA as an indispensable component is offered.

[0015] Although this invention antibody has the strong specific binding force over an antigen (a target cell and effector cell) and it has the description which may activate thru/or reinforce the cell trauma activity over the target cell which effector cells, such as CTL, have by the use, the possibility of the bad influence by ADCC which minded the Fc receptor further is also avoided without performing activation which this effector cell attacks even to a normal cell. Therefore, this invention antibody is especially effective in clinical treatment, such as a malignant tumor.

[0016] the following and this invention antibody -- especially -- on the other hand, per [of this invention antibody which an antibody is the Fab' part of anti-Homo sapiens c-erbB-2 antibody, the antibody of another side is the Fab' part of an anti-Homo sapiens lymphocyte antibody, and this etc. combined / the producing method] -- it explains in full detail.

[0017] As the antibody used as the ingredient for production of this invention antibody, i.e., a monoclonal antibody, anti-Homo sapiens lymphocyte antibodies, such as antibodies, such as anti-c-erbB-2 antibody, thru/or an antitumor antibody, and an anti-CD-3 antibody, can be used, respectively, for example. Anti-c-erbB-2 antibody belonging to the anti-c-erbB-2

above-mentioned antibody is what recognizes c-erbB-2 gene product discovered on the cancer cell front face. To this, GFD-OA-p 185-1 [Alper, O., et al., Cell Growth & Differentiation, 1, and 591-599] (1990), The recombinant DNA which includes Homo sapiens c-erbB-2 gene in a suitable expression vector, and is obtained using gene modification technology is introduced into a suitable animal cell. Carry out the transformation of the animal cell, and the cell which has discovered Homo sapiens c-erbB-2 gene is chosen. Two to SV61 antibody and SV2-61gamma antibody (JP,2-150293,A) which produced the cell discovered to the cell surface as immunogen for c-erbB-2 monoclonal-antibody production, TAb251 antibody, TAb255 antibody, TAb256 antibody, TAb258 antibody, TAb259 antibody (PCT public presentation patent W091 No. -02062 official report), 9G6 antibody [Van de Vijver M.J., et al., New Eng.J.Med., 319, and 1239] (1988), etc. are contained.

[0018] furthermore, as an example of the anti-CD-3 antibody belonging to the above-mentioned anti-Homo sapiens lymphocyte antibody UCHT1 antibody [anti-CD-3 epsilon antibody : A mouse IgG 1 : Beverley and P.C.L. and Callard, R.E., Eur.J.Immunol., 11, and 329-334 : (1981) Imperial cancer research foundation (Imperial Cancer Research Foundation, UK)], OKT3 antibody [-- anti-CD-3 antibody: -- mouse IgG2 a:Kung, P.C., et al., Science, 206, and 347-349 --] (1979) etc. -- it can illustrate. It is known that this UCHT1 antibody is an antibody which recognizes the Homo sapiens CD3epsilon antigen discovered to the cell surface of a T lymphocyte.

[0019] Each antibodies, such as this, can newly produce each monoclonal antibody production hybridoma, or can manufacture it according to a well-known approach [for example, reference (1975), such as Koehler, G. and C. Milstein, Nature, 256, and 495,] using a known monoclonal antibody production hybridoma. As the general approach, a monoclonal antibody production hybridoma is first cultivated using the suitable culture medium for culture, for example, RPMI-1640 culture medium which contains FCS (fetal calf serum) 10%, (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. make). RPMI-1640 culture medium which does not contain PBS (phosphate-buffered saline) or FCS is made to suspend this culture hybridoma, and this suspension is beforehand injected intraperitoneally to the BALB/c nude mouse which injected intraperitoneally pristane (2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane), and was bred. When the mouse abdomen has blistered about 7 - 14 days after the above-mentioned administration, from the abdominal cavity of this mouse, ascites is drained, subsequently centrifugal separation of this ascites is carried out, and ascites is obtained except for a cell. (This ascites to the general approach [Forsgren, A. and J. Sjöquist, J.Immunol., 97, and 822] (1966) A, for example, pro TIN, The target monoclonal antibody can be extracted and refined by performing used affinity chromatography.) The

above-mentioned purification can be carried out by carrying out elution with the 0.1M sodium-citrate buffer solution (pH 3.0-5.0), after applying the mixed liquor which added the 2-4ml joint buffer (1.5M glycine, 3M NaCl, pH8.9) to the ascites per ml in more detail to for example, a pro TIN A SEFA loin (Chisso Corp. make) column and making an antibody stick to a column.

[0020] F(ab')₂ from the monoclonal antibody which are obtained by carrying out like the above Preparation can be performed by carrying out pepsin digestion according to the already reported approach ([Parham, P., J.Immunol., 131, and 2895-2902] (1983)). [for example,] The following approaches can be illustrated as a concrete example of this preparation. that is, the pepsin of 1 / ten to 1/100 time weight of an antibody (sigma company make) is added to the 0.1M sodium-citrate solution (pH 4.1-4.5) which contains a 5-10mg antibody first, it mixes, and a 37-degree C thermostat performs a digestive reaction for 1 to 8 hours. A reaction is stopped adding 1M tris solution to this reaction mixture, and using pH as 8.0, and they are 20mM tris hydrochloric acid and 2mM. EDTA and 150mM(s) Gel filtration is performed using TSK-SW-G3000 (Toso make) column which equilibrated with the solution (it is called the "TES buffer solution" after pH8.0:) which consists of NaCl, and the first peak is pooled. Next, the joint buffer of capacity is added to this reaction mixture two to 4 times, it applies to a pro TIN A column, and bypassing fractions are collected, and perfect pepsin non-digested antibody molecule is made to stick to a column, and is removed. It is concentration F(ab')₂ by performing filtration eye outside for the bypassing fraction obtained in this way using the film of molecular weight 10000. A fraction is obtained. Although yield changes with antibodies, it is usually F(ab')₂ [about about 4-6mg] from a 10mg antibody. It is obtained.

[0021] F(ab')₂ [being obtained by carrying out like the above] BFA which Fab' [a monomer] of the antibody to this invention antibody, i.e., the above-mentioned target cell, and Fab' [a monomer] of an antibody to an effector cell combined using fragmentation is the approach [Nitta, T., et al., Eur.J.Immunol., 19, and 1437-1441] (1989) of Nitta and others. It can follow and produce..

[0022] The above-mentioned approach is F(ab')₂ of the antibody which recognizes the surface antigen of a target cell first, for example, anti-c-erbB-2 antibody. To the TES buffer solution containing fragmentation the last concentration serves as 1-2mM -- as -- a DTT (Wako Pure Chem make) water solution -- in addition after a room temperature performs a reaction for 30 minutes by pH7.5, the last concentration serves as 5mM(s) -- as -- a DTNB (Wako Pure Chem make) water solution -- in addition Furthermore, it carries out by making a reaction perform for 30 minutes at a room temperature, and performing gel filtration using sephadex G25 column (product made from FARUMASHIA) which equilibrated this reaction mixture

with the TES buffer solution, and antibody Fab'-SNB to a target cell can be acquired in this way. F(ab')₂ of the antibody which combines with an effector cell and performs signal transfer independently, for example, an anti-CD-3 antibody, the last concentration becomes the TES buffer solution containing fragmentation with 1-2mM -- as -- a DTT water solution -- in addition, antibody Fab'-SH to an effector cell can be acquired by performing gel filtration using SEFADESSUKU G25 column which performed the reaction for 30 minutes at the room temperature, and equilibrated the reaction mixture obtained with the TES buffer solution by pH7.5. BFA of the request to which it was about 1:1 mole ratio, in addition Fab' [a monomer] of the antibody to a target cell and antibody Fab' [a monomer] to an effector cell combined it with the TES buffer solution containing Fab'-SH obtained above by making it react at a room temperature for about 4 hours after condensing Fab'-SNB of an antibody which recognizes the target cell obtained previously by ultrafiltration membrane can be acquired.

[0023] In the above, per [to an effector cell] antibody, lessons can be taken for a deed and production of antibody Fab'-SH from the antibody to a target cell, production of antibody Fab'-SNB can also be carried out, and desired BFA can be acquired also by this.

[0024] giving BFA obtained in this way to HPLC (high speed liquid chromatography) which uses TSK-gel G3000SW (Toso make) -- an unreacted Fab'-thiol derivative (molecular weight about 55 kd(s)) -- dissociating -- molecular weight -- BFA with about 110 kd(s) can be refined.

[0025] Under nonreduction conditions, it can check having the molecular weight BFA refined above was expected to be by performing PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) analysis 7.5% under existence of 0.1%SDS (sodium dodecyl sulfate: sigma company make).

[0026] Moreover, it is possible to produce BFA which F(ab')_n [a polymer] of the antibody to a target cell and antibody F(ab')_n [a polymer] to an effector cell combined according to the above-mentioned approach. How to produce BFA which this F(ab')_n [a polymer] and F(ab')_n [a polymer] combined is indicated by the manufacturing method of the compound antibody for which this invention persons applied previously (refer to Japanese Patent Application No. No. 229835 [three to]). By supposing that the arm to a target cell is made into plurality according to this approach (F(ab')_n [polymer] use), affinity [as opposed to the target cell in BFA obtained] is raised more, and the curative effect of this invention request is considered may be reinforced further by this.

[0027] According to use of BFA of this invention obtained by above-mentioned carrying out like, the trauma activity over the target cell of effector cells, such as CTL, can be raised. for example, the cancer cell which

will have discovered c-erbB-2 gene product to cell surface if this invention BFA produced using anti-c-erbB-2 antibody and the anti-CD-3 antibody is used -- effective -- a trauma -- or it can be made to necrose test-method [already reported as facts, such as this, were shown in the example of a trial which carries out a postscript -- Staerz, U.D.J.W.Yewdell and M.J.Bevan, Eur.J.Immunol., 17, and 571-574 (1987); Nitta, T., et al., Eur.J.Immunol., 19, and 1437-1441 --] (1989) It can check by the trial which follows.

[0028] In addition, CTL which the constraint nature that the lymphocyte which corresponded as an effector cell must be used in the above does not have, either, for example, cloned can be used, and it is healthy people's peripheral blood lymphocyte (PBL:peripheral bloodlymphocyte). You may use, the coulomb-izing CTL thru/or PBL will be further cultivated three days or more under existence of interleukin-2 etc., and it is LAK (lymphokine activated killer cells). You may guide and use. Preparation of healthy people's peripheral blood lymphocyte can be carried out as the following according to a specific gravity separation method, and can be performed. That is, the PBS buffer solution of weight is added to 10ml of blood of the healthy people who did heparin blood collecting first two to 3 times, and it mixes. After carrying out multistory [of the whole quantity of dilution blood] to the centrifugation tube which added the specific gravity supernatant liquid (for example, a ficoll pack: a Pharmacia manufacture can be used) of the moiety of this dilution blood independently, density-gradient-centrifugation separation is performed for 30 - 40 minutes at 400xg and a room temperature, the nebula layer made after centrifugal between the plasma of a centrifugation tube and a specific gravity supernatant liquid is sucked up, and 10%FCS content RPMI-1640 culture medium washes. It is a peripheral blood lymphocyte one to 2×10^7 in this way. An individual can be obtained. Moreover, LAK is obtained PBL 106 It suspends in 10%FCS content RPMI-1640 culture medium so that it may be set to an individual/ml, and it can guide by adding and cultivating the interleukin-2 of ten to 1000 unit per 1ml of culture media.

[0029] Moreover, the indicator of the target cell by the sodium chromate ($\text{Na}_2 \text{ } ^{51} \text{CrO}_4$) containing radioisotope ^{51}Cr first -- the pellet ($1-2 \times 10^6$ cell) of a target cell -- the 3.7 MBq/ml above-mentioned sodium chromate (the product made from NEN --) The first chemical company sale is added and they are 37 degrees C and 5%CO₂. Culture is performed for 60 - 90 minutes under existence, and subsequently to after culture 10%FCS content RPMI-1640 culture medium can be used, and it can fully wash, and can carry out by removing superfluous unreacted chromium (^{51}Cr). A chromium (^{51}Cr) indicator target cell can be acquired in this way.

[0030] The cytotoxic test using the above-mentioned chromium (^{51}Cr) indicator target cell, an effector cell, and a hybrid antibody 100microl of BFA, and effector cell 106 / 100microl diluted more detailed first to suitable

concentration (usually 0.01–3microg/(ml)) is mixed. It is made to react for 30 minutes at a room temperature, reaction mixture is washed using 10%FCS content RPMI-1640, and the effector cells which the antibody combined are collected as precipitate (unreacted BFA can be removed by this actuation). Next, 150micro (the number of effector cells: 2×10^5) of each 1 of an effector cell and 50microl (the number of cells: 104) of a target cell which the antibody of each concentration combined are added to each well of U bottom culture plate (Corning, Inc. make) of 96 holes, respectively, and they are 37 degrees C and 5%CO₂. It cultivates under existence and the unique trauma reaction of a target cell is performed. The activity activity of each well is counted after a reaction. According to the following formula (1), it can ask for extent (%) of the specific trauma of the target cell which happens when combining an effector antibody and a target cell through BFA.

[0031]

specific — trauma % = $[(a-b)/(c-d)] \times 100$ (1)

The radioactivity (the maximum emission) in reaction mixture when c dissolves a target cell for the activity activity in a well when b cultivates only a target cell for the actual measurement which shows specific 51Cr emission of the target cell by the effector cell [a minded BFA (spontaneous emmission) using 1%NP-40 (sigma company make) solution is shown, respectively.]

According to the above-mentioned cytotoxic test, it was checked that about 25% of specific target cell trauma is observed by the 100 ng/ml dosage, and this invention BFA and especially this invention BFA produced using Fab' of anti-c-erbB-2 antibody and Fab' of an anti-CD-3 antibody have high target cell trauma ability from this (refer to drawing 1 -A which carries out a postscript). On the other hand, F(ab')₂ of anti-c-erbB-2 antibody F(ab')₂ of fragmentation and an anti-CD-3 antibody With the mixed liquor which only mixed fragmentation by the ratio of 1:1, even if it raised concentration to 1000 ng/ml, significant cytotoxicity was not accepted (refer to drawing 1 -B which carries out a postscript). Moreover, F(ab')₂ of each parents Significant cytotoxicity was not accepted even if fragmentation also raised concentration to 1000 ng(s)/ml.

[0032] Thus, since this shows the specific cell trauma activity of a target cell from the ultralow volume of 10 ng(s)/ml (refer to drawing 1 -A which carries out a postscript), BFA of this invention which the Fab' fragmentation of the antibody to a target cell and the Fab' fragmentation of an antibody to an effector cell combined is useful as the therapy agent, especially milk cancer treatment agent of the malignant tumor by the cancer cell which has discovered c-erbB-2 gene product to cell surface.

[0033] Moreover, this invention BFA applies the high bonding strength maintenance nature to the target cell, and can use it as various kinds of diagnostic drugs instead of the conventional monoclonal antibody besides the

above-mentioned therapy agent.

[0034] As mentioned above, this invention antibody is effective as a malignant tumor therapy agent, therefore the malignant tumor therapy agent concerning this invention is also offered. Others can be prepared according to the technical means commonly used by the immunotherapy using a usual pharmaceutical preparation technique thru/or this usual kind BFA etc. on the basis of this this invention malignant tumor therapy agent containing Above BFA as that indispensable component. That is, with this invention antibody, this therapy agent blends suitable physic pharmaceutical preparation support, and is usually prepared by the gestalt of a pharmaceutical preparation constituent. Various kinds of things usually commonly used by preparation of the pharmaceutical preparation according to a use gestalt as support used, For example, the formulation which any of excipients, such as a bulking agent, an extending agent, a binder, a surface active agent, the buffer solution, and a stabilizing agent, thru/or a diluent are sufficient as, and is prepared Although you may be ** agents, such as a tablet and powders, it is [that what is necessary is just in the condition that this contains this invention therapy agent component effectively] good to usually consider as injections gestalten, such as liquids and solutions, suspension, and an emulsion. Moreover, this can also be made into the gestalt of the desiccation article which can be made by addition of support suitable before use as it is liquefied, and can prepare any gestalt according to a conventional method. moreover, according to the gestalt, intraperitoneal administration of the pharmaceutical preparation of each gestalt is carried out in intramuscular, hypodermically, and a hide in a vein by the pharmaceutical preparation of a suitable route of administration, for example, an injections gestalt, -- having -- the pharmaceutical preparation of a solid gestalt -- taking orally -- or enteral administration is carried out. Of course, after making this invention antibody react to a lymphocyte etc. outside a body beforehand, it is also a useful approach to medicate intraperitoneal, the infection focus, etc. with it in a vein.

[0035] Although the dose of this invention therapy agent is suitably determined according to the medication method of this pharmaceutical preparation, an administration gestalt, the purpose of use, an application patient, etc. and is not fixed, it is good for the amount of this invention antibody to contain about about 0.00001 to 80% of the weight generally, and, as for this pharmaceutical preparation, it is desirable to be applied in about 0.01micro per day adult about g-10mg. In this way, according to administration of this invention therapy agent, the cytotoxicity of a lymphocyte is reinforced in a patient's inside of the body medicated with this, and a desired curative effect is done so.

[0036] Moreover, after activating an adoptive immunity therapy, i.e., the

lymphocyte once extracted from the patient living body, with a certain means among the immunotherapy using this invention therapy agent, it can carry out as following by carrying out the approach of treating by returning again in patient the living body. Namely, separate a lymphocyte from about 100ml of a patient's peripheral blood, and it cultivates about about one week by the serum free medium which added IL-2 abbreviation 100U/ml. LAK cell about 1×10^8 obtained (lymphokine activation killer cell) An individual BFA about 100-1000microg of this invention, It carries out by pouring into the patient inside of the body with about 100microg order preferably, and this treatment can usually be performed in several steps according to a patient's condition of disease, age, etc. per week.

[0037]

[Effect of the Invention] this invention antibody has the strong specific binding force over an antigen (a target cell and effector cell), and has the description which may activate thru/or reinforce the cell trauma activity over the target cell which effector cells, such as CTL, have by the use.

[0038]

[Example] Hereafter, in order to explain to a detail from per [using this invention BFA and this / a malignant tumor therapy agent], this invention which gives an example is not limited to this.

[0039]

[Example 1] Manufacture 1 of BFA The preparation UCHT1 cell [anti-CD-3 epsilon antibody of UCHT1 ascites: Mouse IgG 1 :Beverley, P.C.L.and Callard, R.E., Eur.J.Immunol., 11, and 329-334 (1981) : Imperial cancer research foundation (Imperial Cancer Research Foundation, UK) RPMI-1640 culture medium (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. make) which contains FCS (flow company make) for acquisition] 10% is used. 37 degrees C and 5%CO₂ It cultivated under existence and the hybridoma was obtained.

[0040] Independently, intraperitoneal [of BALB/c (Charles River Japan, INC. make)] was medicated with 0.5ml [per animal] pristane (2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane, Wako Pure Chem make), and breeding was performed to it for one to two weeks.

[0041] Next, UCHT1 cell obtained previously is suspended in PBS, and it is the 1×10^7 . It medicated each mouse intraperitoneal with every cell / 0.5ml. When the abdominal cavity of a mouse had blistered at the 2 - 3rd week of the above-mentioned administration, ascites was drained from the abdominal cavity of a mouse, centrifugal separation of this ascites was carried out at 4 degrees C for 10000rpm and 30 minutes using Hitachi centrifuge 05--22 (Hitachi, Ltd. make), and antinode Minakami ** containing UCHT1 antibody was obtained.

[0042] 2) UCHT1-F(ab')₂ It is 1.5M glycine of 2 double capacity, and 3M to UCHT1 antinode Minakami ** obtained by the preparation above 1 of

fragmentation. The buffer solution (pH8.9) which consists of NaCl was added, it mixed, mixed liquor was applied to the fixed protein A (Immobilized-Protein A) column (Repligen shrine), and UCHT1 antibody was made to stick to a column. It is fully 1.5M glycine and 3M. After the buffer solution (pH8.9) which consists of NaCl washed, elution of the UCHT1 antibody to which it is sticking was carried out with the 0.1M sodium-citrate buffer solution (pH 3.0-5.0), and the IgG solution was obtained.

[0043] 2ml (IgG10mg) of IgG solutions obtained above was dialyzed at 4 degrees C to the 0.1M sodium-citrate buffer solution (pH4.1) overnight. It is the pepsin (sigma company make) of 1/[1/10 of an antibody -] 25 amount (w/w) to this after collecting dialysing fluid. In addition, it mixed and the 37-degree C thermostat performed the digestive reaction for 6 to 8 hours. After a reaction, 1M tris solution 1 / 2 capacity is applied to reaction mixture, a reaction is stopped, and it is 150Mm. Gel filtration is performed using the TSK-G3000SW (Toso make) column (21.5mmIDx60cm) which equilibrated with the NaCl content 20mM phosphate buffer solution (pH7.0), and it is F(ab') 2. The fraction was pooled.

[0044] Next, it is 1.5M glycine and 3M to this fraction isolated preparatively. Added the buffer solution (pH8.9) which consists of NaCl, applied that mixed liquor to the pro TIN A column, collected bypassing fractions, the non-digested pepsin UHCL1 antibody was made to stick to a column, and it removed. An ultrafiltration (the Amicon make, the diamond flow membrane YM10, and 43mm film are used) is performed for the drawing section of bypassing obtained in this way using the film of molecular weight 10000, and they are 20mM tris hydrochloric acid and 2mM about a buffer. EDTA and 150mM(s) It exchanges for the solution (it is called the "TES buffer solution" after pH8.0:) which consists of NaCl, and is 1 UCHTF(ab') 2. 4mg of fragmentation was obtained.

[0045] 3) 185 to GFD-OA-p1 antibody as an antibody which recognizes preparation **** Homo sapiens c-erbB-2 gene product of 185 to GFD-OA-p1 ascites was prepared as follows. That is, after cultivating hybridoma GFD-OA-p 185-1 (Fermentation Research Institute mycoparasite No. 12206) which produces 185 to GFD-OA-p1 antibody like the above 1, intraperitoneal [of a mouse] was medicated with this cell and antinode Minakami ** which contains 185 to GFD-OA-p1 antibody from this ascites was obtained.

[0046] 4) GFD-OA-p185-1-F(ab') 2 It is 1.5M glycine of 2 double capacity, and 3M to GFD-OA-p185-1 antinode Minakami ** obtained by 3 like the preparation above 2 of fragmentation. The mixed liquor which added the buffer solution (pH8.9) which consists of NaCl was applied to the pro TIN A column, and column adsorption of the 185 to GFD-OA-p1 antibody was carried out. After washing by this buffer, elution of the 185 to GFD-OA-p1

antibody to which it is sticking was carried out with the 0.1M sodium-citrate buffer solution (pH 3.0-5.0), and the solution containing IgG was obtained.

[0047] 2ml (IgG10mg) of solutions containing IgG obtained above was dialyzed at 4 degrees C to the 0.1M sodium-citrate buffer solution (pH4.1) overnight. After collecting dialysing fluid, the pepsin of 1/[1/10 of an antibody -] 25 amount (w/w) was added to this, it mixed, and the 37-degree C thermostat performed the digestive reaction for 4 to 8 hours. After a reaction, 1M tris solution 1 / 2 capacity is applied to reaction mixture, a reaction is stopped, and it is 150Mm. Gel filtration is performed using the TSK-G3000SW column which equilibrated with the NaCl content 20mM phosphate buffer solution (pH7.0), and it is F(ab') 2. The fraction was pooled. [0048] Next, it is 1.5M glycine and 3M to this fraction. Added the buffer solution (pH8.9) which consists of NaCl, applied that mixed liquor to the protein A column, collected bypassing fractions, the non-digested pepsin 185 to GFD-OA-p1 antibody was made to stick to a column, and it removed. An ultrafiltration is performed for the drawing section of bypassing obtained in this way using the film of molecular weight 10000, a buffer is exchanged for the TES buffer solution, and it is 185 to 1 GFD-OA-pF(ab') 2. Fragmentation 5mg was obtained.

[0049] 5) F(ab') 2 of 185 to GFD-OA-p1 antibody prepared by the production above 4 of BFA of GFD-OA-p185-1Fab' and UCHT1-Fab' To the 1.0mlTES buffer solution containing fragmentation 3mg the 100mM dithiothreitol (DTT; Wako Pure Chem make) water solution of 20microl -- after [in addition,] performing a reaction for 30 minutes at pH7.5 and a room temperature -- succeedingly -- 10mM(s) the DTNB water solution (Wako Pure Chem make) 1 - the amount of 2 double -- in addition, the reaction was made to perform for 30 minutes at a room temperature further Gel filtration of this reaction mixture was carried out using sephadex G25 column which equilibrated with the TES buffer solution permuted with nitrogen gas, the first peak was pooled, and the mixed nitrophenyl disulfide derivative (GFD-OA-p185-1-Fab'-SNB) of GFD-OA-p185-1-Fab' was acquired.

[0050] F(ab') 2 of UCHT1 antibody independently prepared by the above 2 To the 1.0mlTES buffer solution containing fragmentation 3mg The DTT water solution of 20microl In addition, after a room temperature performs a reaction for 30 minutes by pH7.5, Gel filtration of the obtained reaction mixture was carried out using sephadex G25 column which equilibrated with the TES buffer solution permuted with nitrogen gas, the first peak was pooled, and UCHT1-Fab'-SH was acquired.

[0051] BFA which the monomers of GFD-OA-p185-1-Fab' and UCHT1-Fab' combined was obtained by adding GFD-OA-p185-1-Fab'-SNB prepared previously to the above-mentioned UCHT1-Fab'-SH, making it react to it at

a room temperature after concentration by ultrafiltration membrane (YM10) for 4 hours, and making it continue a reaction at 4 degrees C henceforth.

[0052] The target BFA was separated and refined from the unreacted Fab'-thiol derivative (molecular weight about 55 kd(s)) by giving the TES buffer solution containing BFA obtained above to HPLC (high performance chromatography) or ion exchange chromatography which used TSK gel G3000SW (Toso make), or a hydroxyapatite column chromatography.

[0053] The molecular weight of BFA which refined 7.5%PAGE analysis by performing refined BFA under 0.1%SDS (sodium-dodecyl-sulfate, sigma company make) existence under nonreduction conditions was checked.

[0054] As a result of above-mentioned SDS-PAGE, the band was checked in the location of molecular-weight abbreviation 110kd, and it was checked from this that BFA has prospective molecular-weight abbreviation 110kd.

[0055]

[Example 2] This invention BFA and GFD-OA-p185-1-F(ab')₂ which were obtained in the example 1 Fragmentation and UCHT1-F(ab')₂ Immunological reactivity with fragmentation was examined using the peripheral blood lymphocyte (PBL) prepared from seven Homo sapiens cancer cell stocks and healthy Homo sapiens volunteers as follows.

[0056] Seven Homo sapiens cancer cell stocks (all come to hand from American type culture collection, ATCC;Rockville, and Md.U.S.A.) shown below were used for this trial.

[0057] ZR-75-1 (Homo-sapiens cancer-cells-of-breast-carcinoma stock: ATCC CRL1500)

SK-BR -3 (Homo-sapiens mammary-gland cancer-cell stock: ATCC HTB30)

MCF-7 (Homo-sapiens mammary-gland cancer-cell stock: ATCC HTB22)

PANC-1 (Homo sapiens pancreas, epithelium adenocarcinoma cell stock:ATCC CRL1469)

MIAPaCa-2 (Homo-sapiens pancreas cancer-cell stock: ATCC CRL1420)

ASPC-1 (Homo-sapiens metastatic pancreas cancer-cell stock: ATCC CRL1682)

BxPC-3 (primary Homo-sapiens pancreas cancer-cell stock: ATCC CRL1687)

About PBL of the seven above-mentioned Homo sapiens cancer cell stocks and healthy volunteers, they are 0.1%BSA and 0.1%NaN₃, respectively. After the included PBS buffer solution washed, each antibody of 10microg was added into this PBS buffer solution, and it was made to react for 30 minutes in Hikami. The cell was washed twice after the reaction, subsequently the FITC-compound anti-mouse IgG (Tago Inc. and U.S.A. shrine make) was added, and it was made to react for 30 minutes further in Hikami. After the reaction, it washed twice and, subsequently the labile of each antibody was measured by the flow cytometry which used the alt.spectrum III (Ortho

Diagnostic Inc. and U.S.A. shrine make). In addition, the quantum of the electropositive cell was carried out as what owns the fluorescence intensity for a numeral.

[0058] The result is shown in the 1st table.

[0059]

[Table 1]

第 1 表

細 胞	対 照 ^{a)}	F (a b ') 2 フラグメント		
		抗 c - e r b B - 2 遺伝子産物	抗 C D 3	B F A
P B L	2. 7 ^{b)}	4. 9	8 2. 7	8 2. 8
Z R - 7 5 - 1	8. 2	8 5. 5	2. 6	9 2. 9
S K - B R - 3	2. 0	9 9. 5	2. 9	9 9. 9
M C F 7	4. 8	4 0. 3	1. 9	4 7. 4
P A N C - 1	4. 6	2 4. 4	3. 6	2 5. 9
M I A P a C a - 2	2. 2	6 1. 4	5. 2	6 1. 9
A s P C - 1	9. 6	3 3. 5	N T	2 2. 1
B x P C - 3	2. 8	8. 8	2. 4	8. 6

a) : 第 2 抗体のみ

b) : 各抗体と反応した細胞%

[0060] This front Naka and a figure show the percent (%) of each antibody and variegated ** which reacted. Moreover, control (contrast) expresses only the 2nd antibody and NT shows un-examining.

[0061] From this table, it is anti-c-erbB-2 gene product F(ab') 2.

Fragmentation reacted strongly to two cancer-cells-of-breast-carcinoma stock ZR-75-1 and SK-BR -3. Two cancer cell stocks, such as this, are cancer cell stocks with which discovering c-erbB-2mRNA to abundance is known [Kraus, M.H., et al., EMBO J., 6, and 605-610] (1987). Moreover, this F(ab') 2 Fragmentation showed cancer cell stock MCF-7, PANC-1, MIAPaCa-2 and ASPC-1, and weak reactivity (comparing with two front

cancer cell stocks), and hardly showed reactivity to cancer cell stock BxPC-3. Furthermore, it did not react in PBL.

[0062] Anti-CD-3 epsilonF(ab')₂ Fragmentation reacted only to PBL and did not react with a cancer cell stock. This invention BFA reacted strongly to two Homo sapiens cancer-cells-of-breast-carcinoma stock ZR-75-1 and SK-BR -3, and PBL(s). Moreover, this labile of BFA is the anti-c-erbB-2 above-mentioned gene product F(ab')₂ to other Homo sapiens cancer cell stocks. It was the same as that of FUSEGUMENTO.

[0063] BFA of this invention became clear [that it is what holds the expected immunological description] from test results, such as this.

[0064]

[Example 3] According to the following approaches, it carried out by making into an index the specific dissolution of the target cell which happens when PBL is used as an effector cell, ZR-75-1 and SK-BR -3 are used as a target cell, respectively and each effector cells, such as this, and a target cell combine the cell trauma activity measurement of this invention BFA obtained in the example 1 through BFA.

[0065] ** Use RPMI-1640 culture medium containing 10% of 51 indicators FCS by Cr(s) of a target cell, and it is 5%CO₂ at 37 degrees C about ZR-75-1 cell and SK-BR-3 cell. It cultivated under existence. Next, a culture supernatant is removed and it is PBS (-). 2.5ml of EDTA-PBS solutions was added to each cultured cell 0.05% trypsin-0.05% after washing by 25 ml, it incubated for 1 minute at 37 degrees C; and the cell was removed, and 20ml of 10%FCS content RPMI-1640 culture media was made to suspend, and it neutralized, and washed centrifugally by this culture medium twice at the room temperature for 1000rpm and 8 minutes.

[0066] Subsequently, the sodium chromate (Na 251CrO₄ : product made from NEN) of 3.7MBq(s) is added to precipitate (5x10⁶ cell) of each obtained cell. It is 5%CO₂ at 37 degrees C. Perform culture for 60 minutes under existence, wash culture medium twice using 10%FCS content RPMI-1640 culture medium, and a superfluous sodium chromate is removed. The concentration of the culture medium after counting the number of cells by the erythrocytometer is 2x10⁵. It diluted with 10%FCS content RPMI-1640 culture medium so that it might be set to a cell/ml.

[0067] ** 50ml of PBS buffer solutions is added to 50ml of healthy human blood liquid in which the effector cell (PBL) carried out preparation heparin blood collecting, and it mixes, adds 15ml (RIMPO site separation MEDIUM: flow (Flow Laboratorues) company make) of specific gravity supernatant liquids at a time to four 50ml centrifuging tubes independently, and carried out multistory [of every 25ml of the previous blood] to each tubing, such as this. Then, density gradient centrifugation was performed at the room temperature for 1500rpm and 30 minutes using Hitachi centrifuge O5--22.

[0068] The nebula layer made between the plasma in four centrifuging tubes and a specific gravity supernatant liquid was sucked up using Pasteur pipette after centrifugal, and this was moved to a 50ml new centrifuging tube, 10%FCS content RPMI-1640 25ml culture medium was added, and it mixed, and 1000 rpm, centrifugal was carried out for 5 minutes and PBL(s) were collected as precipitate. After repeating the washing actuation by 10%FCS content RPMI-1640 culture medium 3 times, 10%FCS content RPMI-1640 culture medium was made to suspend the obtained precipitate.

[0069] ** The GFD-OA-p185-1-Fab'-UCHT1-Fab' joint mold BFA of this invention obtained in the preparation example 1 of each antibody, GFD-OA-p185-1-F(ab') 2 used as a start ingredient of this BFA production Fragmentation and UCHT1-F(ab') 2 1:1 mixture with fragmentation, GFD-OA-p185-1-F(ab') 2 Fragmentation and UCHT1-F(ab') 2 Each of fragmentation After carrying out sterile filtration of each using mirex GV filter 0.22microM (Nihon Millipore make) using 10%FCS content RPMI-1640 culture medium, dilution preparation was carried out at each concentration (2 ng/ml, 20 ng/ml, 200 ng/ml, and 2000 ng(s)/ml).

[0070] ** Antibody 100microl and 50micro [of effector cells] I (the number of cells = 5×10^4 the individual, Effector;E) of various concentration which were prepared by the cell trauma activity test above-mentioned **, 50microl (1x10⁴ an individual and Taget;T) of a target cell is added to each well of a 96 hole U bottom culture plate (falcon (Falcon) company make), respectively (Effector/Taget =E/T=5). 37 degrees C and 5%CO₂ It cultivated under existence for 4 hours, and the specific trauma reaction of a target cell was made to perform. Next, the culture supernatant was extracted by the super NETANTO collection system (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. make), it put into the measurement tube, and the activity activity included in this tube was counted. Moreover, the ratio (E/T) of an effector cell and a target cell was replaced with 0, 10, and 20, and each antibody was made to react on the same conditions as the above.

[0071] It asked for extent (%) of the specific trauma activity of the target cell which happens when combining an effector cell and a target cell through each antibody according to said formula (1).

[0072] The obtained result is shown in drawing 1 and drawing 2 .

[0073] Drawing 1 shows the result of having used this invention BFA to ZR-75-1 cell, and drawing 2 is GFD-OA-p185-1-F(ab') 2 to ZR-75-1 cell. Fragmentation and UCHT1-F(ab') 2 The result at the time of using 1:1 mixture with fragmentation is shown.

[0074] An axis of ordinate shows specific trauma % (% Specific Cytotoxicity) of a target cell for the absolute magnitude (ng/ml) of the antibody which used the axis of abscissa in each drawing, and among drawing, in (2), when (1) is E/T=10 about the case of E/T=5 in the case of E/T=0, (4) shows [(3)

] the case of E/T=20, respectively.

[0075] From above-mentioned drawing 1, it was checked that BFA of this invention combined with PBL holds significant cell trauma activity in the case of ZR-75-1 cell. The concentration of BFA required for the manifestation of this cell trauma activity was 10 ng/more than ml, and the E/T ratio was five or more. Moreover, this invention BFA is a 100 ng(s)/ml dosage, and the E/T ratio could observe the specific target cell trauma of about 25% of maxes by 20, and having high target cell trauma activity from this was checked. On the other hand, GFD-OA-p185-1-F(ab')₂ Fragmentation and UCHT1-F(ab')₂ When 1:1 mixture with fragmentation was used, even if it raised concentration to 1000 ng/ml, significant cell trauma activity was not accepted (refer to drawing 2).

[0076] Furthermore, GFD-OA-p185-1-F(ab')₂ Fragmentation and UCHT1-F(ab')₂ As a result of performing the same trial using each of fragmentation, even if each fragmentation, such as this, raised concentration to 1000 ng(s)/ml, significant cell trauma activity was not accepted.

[0077] From the above result, this invention BFA shows the specific cell trauma activity of a target cell from the microscopic small amount of 10 ng(s)/ml, and c-erbB-2 gene product is understood from this that it is useful as the therapy agent, especially milk cancer treatment agent of the malignant tumor which consists of a cancer cell discovered to cell surface.

[0078] Moreover, if the high bonding strength maintenance nature to the target cell of this invention BFA is applied, instead of the conventional mono-crawl antibody, the use as various kinds of diagnostic drugs is also expectable besides the above-mentioned therapy agent of this invention request.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the graph which investigated the cell trauma activity of this invention BFA.

[Drawing 2] It is the graph which investigated the cell trauma activity of the antibody mixture considered as contrast as contrasted with drawing 1 .

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-213775

(43)公開日 平成5年(1993)8月24日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	A D U G	8413-4C		
	T	8413-4C		
	Z	8413-4C		
C 0 7 K 15/28		7731-4H		

審査請求 未請求 請求項の数6(全12頁)

(21)出願番号	特願平4-19968	(71)出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(22)出願日	平成4年(1992)2月5日	(72)発明者	杉山 孔宏 徳島県板野郡北島町中村字蛇池1-6メゾン・ド・フローラ106号
		(72)発明者	柏原 美紀 徳島県板野郡北島町中村字前須34セジュール浜田1-104
		(72)発明者	柴森 雅文 徳島県徳島市川内町加賀須野463-10
		(74)代理人	弁理士 掛樋 悠路 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 B F A抗体

(57)【要約】

【構成】本発明は、複合抗体を構成する一方の抗体がヒトc-e r b B-2特異性抗体であり、他方がヒトリンパ球抗体であることを特徴とする複合抗体、特に標的細胞の表面抗原を認識する抗体が抗ヒトc-e r b B-2抗体であって、エフェクター細胞に結合してシグナル伝達を行なう抗体が抗ヒトリンパ球抗体である上記複合抗体及び該複合抗体を必須成分とする癌治療剤を提供する。

【効果】本発明複合抗体は、癌治療、特にヒト乳癌等の悪性腫瘍治療に有効である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 複合抗体を構成する一方の抗体がヒト c-e r b B-2 特異性抗体であり、他方がヒトリンパ球抗体であることを特徴とする複合抗体。

【請求項2】 標的細胞の表面抗原を認識する抗体が抗ヒト c-e r b B-2 抗体であって、エフェクター細胞に結合してシグナル伝達を行う抗体が抗ヒトリンパ球抗体である請求項1に記載の複合抗体。

【請求項3】 抗ヒト c-e r b B-2 抗体が G F D-O A-p 1 8 5-1 である請求項1又は2に記載の複合 10 抗体。

【請求項4】 抗ヒトリンパ球抗体が抗 C D 3 抗体である請求項1又は2に記載の複合抗体。

【請求項5】 ヒト c-e r b B-2 関連蛋白に特異的に反応する請求項1又は2に記載の複合抗体。

【請求項6】 請求項3に記載の複合抗体を必須成分とすることを特徴とする癌治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は癌治療に有効な複合抗体、より詳しくはヒト乳癌等の悪性腫瘍治療に有効な複合抗体及び癌治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、癌免疫療法においてモノクローナル抗体は抗体依存性細胞性細胞傷害作用 (A D C C ; antibody-dependent cellular cytotoxicity) [Martin, J. S., et al., Blood, 73, 1431-1439 (1989)] と或るいは補体依存性溶菌作用 (complement-dependent cytotoxicity) [Irie, R. F., et al., Proc. Natl. Acad. U.S.A., 83, 8649-8698 (1986)] に基づく受動免疫により広く臨床試験が 30 なされた。しかしながら、癌治療のために必要な効能のある細胞傷害性免疫反応を誘導するモノクローナル抗体は例外的であった。之等の臨床結果はモノクローナル抗体による癌治療の研究の限界を示すものであった。

【0003】 上記モノクローナル抗体による問題点を克服するための有力な方法として、異なった二種類の抗体分子を解離させ、再結合してハイブリッド抗体を得る試みがなされ、これは古くはウサギポリクローナル抗体を用いて行なわれている [Nisonoff, A. and M. M. Rivers, Arch. biochem. Biophys., 93, 460 (1961)] が、実際にこれ 40 が広く知られたのはモノクローナル抗体の作製技術が開発されてからである。[Koehler, G. and C. Milstein, Nature, 256, 495 (1975)].

【0004】 これら二種類のモノクローナル抗体のそれぞれの半分ずつを化学的に結合させてハイブリッド抗体 (モノマータイプ) を作製する方法は数多く報告され、之等は一般に F (a b')₂ 分子を材料として作製されている。例えばブレンナン (Brennan) らは D T T (ジチオスレイトール) の還元剤を用いて該 F (a b')₂ 分子を還元処理し、一方の F a b' の S H 基を 5, 5' - 50

2

ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (D T N B) で保護して F a b' - S N B とし、他方の F a b' - S H と混合することにより、高収率でモノマータイプのハイブリッド抗体を作製することに成功している [Brennan, M., P. F. Davison and H. Pavlus, Science, 229, 81-83 (1985); Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989) 参照]。

【0005】 また別の方法としては、異なった二種類の抗体分子を架橋剤 S P D P [N-スクシンイミジル-3-(1-ビリジルジチオ)プロピオネート] により連結したダイマータイプのハイブリッド抗体を作製する方法 [Staerz, U. D., et al., Nature, 314, 628-631 (1985)] や、二種類の抗体 F (a b')₂ フラグメントを同様にして架橋剤 S P D P を用いて結合させたダイマータイプのハイブリッド抗体を作製する方法 [Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989)] 等がある。

【0006】 ハイブリッド抗体を作製するもう一つの手段としては、細胞融合法を利用する方法がある。例えば、ある抗原に対する抗体生産ハイブリドーマを、別の抗原で免疫した動物の脾細胞と融合させて、ハイブリッド抗体生産ハイブリドーマを得、該ハイブリドーマの培養によって目的とするハイブリッド抗体を得る方法 [Milstein, C. and A. C. Cuello, Nature, 305, 537 (1983)] や、異なった抗体生産ハイブリドーマを相互に細胞融合させてハイブリッド抗体生産ハイブリドーマを得、これより所望の抗体を得る方法 [Staerz, U. D. and M. J. Bevan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 1453 (1986); Lanzavecchia, A. and D. Scheidegger, Eur. J. Immunol., 7, 105 (1987)] 等がある。

【0007】 更に、別の型のハイブリッド抗体としては、抗原結合活性を有する可変部 (V) 領域をマウスハイブリドーマ由来で、免疫活性を有する定常部 (C) 領域をヒト由来のものにしたものが知られている。該抗体の製造方法は遺伝子組み換え技術を用いて試みられた 1984 年のモリソン (Morrison) の他、様々な特異性をもつこの種ハイブリッド抗体の作製方法が例示されている [Morrison SL et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851 (1984); Sharon J. et al., Nature, 309, 364 (1984); Neuberger, M. S., et al., Nature, 312, 604 (1984); Boulianne, G. L., et al., Nature, 312, 634 (1984) 等]。更に、新しい型のハイブリッド抗体としては、V 領域の相補性決定領域 (C D R) のみをマウス由来としたもの (Reshaped 抗体) をも例示できる [Jones, P. T., et al., Nature, 321, 552 (1986); Riechman L., et al., Nature, 332, 323 (1988)]。

【0008】 上記ハイブリッド抗体の応用は以下に述べる癌治療の他に、イムノアッセイ系への利用 [Suresh, M. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 7989-7993 (1986)]、免疫組織化学での利用 [Milsten, C. and A. C. Cuello, Nature, 305, 537 (1983)] 等が報告されて

いる。また、上記モノクローナル抗体による癌治療より一歩進歩した形にかかる異なった二種類の抗体のハイブリッド抗体〔複合抗体（以下、BFA; Bifunctional antibodyと略称する）の一方の抗体が癌細胞と会合した抗原を認識し、該BFAの他方の抗体がTリンパ球のT細胞抗原を認識するBFAを作製することができる。該BFAの構造に基づき、標的とする癌細胞に結合することができるBFAが標的癌細胞に対し細胞傷害活性を持つことができる。この機序により癌治療への期待がなされた。その後、インビトロにおいて、BFAの活性がいくつかの腫瘍細胞で研究された[Mezzanica, D., et al., *Int. J. Cancer*, 41, 609-615 (1988); Mansfield, P. F., et al., *Cancer Immunol. Immunother*, 33, 247-254 (1991); Oshimi, K., et al., *Blood*, 77, 1044-1049 (1991); Nitta, T., et al., *E. J. Immunol.*, 19, 1437-1441 (1989)]。

【0009】更に神経膠腫、卵巣癌、肺癌に対してもBFAの臨床研究が着手された[Nitta, T., et al., *Lancet*, 335, 368-371 (1990); de Leij, L., et al., *Fondation Nationale de Transfusion Sanguine, Les Ulis France*, 249-253 (1990)]。

【0010】一方、近年、細胞生物学の著しい進歩により細胞における増殖因子レセプターと発癌との係わりが注目されてきた。数ある癌遺伝子産物のうちの一つとして特に受容体型チロシンキナーゼ（チロシン残基特異的蛋白質リン酸化酵素）のうち、上皮細胞成長因子(epidermal growth factor; EGF)と該EGFの受容体（レセプター）と酷似する蛋白質をコードする関連癌遺伝子として見い出されたc-erbB-2遺伝子[Yamamoto, T., et al., *Nature*, 319, 230-234 (1986)]の癌遺伝子産物であるp185遺伝子は、種々のヒト悪性腫瘍において該遺伝子の増幅と癌遺伝子産物の高発現が認められており、特に乳癌、胃癌、肺癌、脾臓癌中に高頻度のc-erbB-2遺伝子の増幅が認められている。その腺癌、特に乳癌については、ヒト乳癌と乳癌由来の培養細胞にc-erbB-2遺伝子の増幅が認められ[King, C. R., et al., *Science*, 229, 974-976 (1985); Yamamoto, T., et al., *Nature*, 319, 230-234 (1986)]、該c-erbB-2遺伝子の増幅の程度が、乳癌の予後と強い相関を示すことが既に見出されている[Slamon, D. J., et al., *Science*, 235, 177-182 (1987)]。しかしながら、該遺伝子産物の発現は正常成人組織には、極まれにしか認められない[Natali, P. G., et al., *Int. J. Cancer*, 45, 457-461 (1990)]。

【0011】上記c-erbB-2蛋白質に対する抗体やモノクローナル抗体も既に開発され、病理材料のみならず、手術材料を直ちに免疫染色法によって検査する方法も開発されつつあり[Masuko, T., et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 10-14 (1989); Yamada, Y., et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 1192-1198 (1989)]、c-erb

B-2遺伝子産物を認識する抗体としても、例えばc-erbB-2遺伝子のC末端領域を認識するポリクローナル抗体、pAb1 (T4881) [トリトンバイオサイエンス社製(Triton Bioscience Inc.; Alameda, CA)]やキナーゼドメインを認識するポリクローナル抗体Ab-1 [オンコジーンサイエンス(Oncogene Science Inc.; Manhasset, NY)]や、c-erbB-2の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体、SV2-61γ [株式会社ニチレン（特開平2-150293号公報参照）]等が知られ、本発明者らも先に腺癌、特に乳癌の診断剤及び治療剤を提供する目的でヒト乳癌細胞株SK-BR-3 (ATCC寄託番号; ATCC HTB30) の培養上清で免疫した哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物の骨髄細胞との融合により形成されたハイブリドーマにより産生され、c-erbB-2関連蛋白質に特異的に反応する抗c-erbB-2モノクローナル抗体、GFD-OA-p185-1を作製した[Uozge, Alper, et al., *Cell Growth & Differentiation*, 1, 591-599 (1990)]。上記GFD-OA-p185-1抗体は、c-erbB-2遺伝子を発現するヒト癌細胞株SK-BR-3及び、A-549 (ヒト肺癌細胞株; ATCC CCL185) のインビトロでの増殖を有意に抑制した(特願平3-229835号)。上記各抗体は、c-erbB-2蛋白質とそれぞれ反応し、c-erbB-2遺伝子産物の発現と関連する疾患、特に腺癌、中でも乳癌等の診断に有用であるが(特開平3-191865号公報参照)、これらの抗体は上記悪性腫瘍の治療剤としては、前記したようにモノクローナル抗体であり、必ずしも良好な治療効果が予想されない。本発明者らはより一般的な上皮癌に対するBFAによる免疫治療法を開発するために、c-erbB-2遺伝子産物に関連するものを標的とするBFAを開発し、インビトロにおけるBFAの抗腫瘍活性を評価し、ここに本発明を完成するに至った。

【0012】尚、c-erbB-2に関連するBFAについては、今だ報告はなく、本発明によりBFAを構成する一方の抗体が抗ヒトc-erbB-2抗体からなる複合抗体を提供することが初めて可能となった。

【0013】

【発明が解決しようとする問題点】本発明はc-erbB-2遺伝子を発現する細胞、特に乳癌、肺癌、胃癌、脾臓癌等の悪性腫瘍細胞等の標的細胞と、細胞傷害性Tリンパ球細胞(Cytotoxic T lymphocytes)等のエフェクター細胞とを特異的に結合させることができ、しかもこれによって上記エフェクター細胞の有する上記標的細胞に対する細胞傷害活性を増強させ得る新しいBFA(複合抗体)、及びこれを利用した悪性腫瘍等の臨床治療剤を提供することを目的とするものである。

【0014】

【問題を解決するための手段】本発明によれば、BFA(複合抗体)を構成する一方の抗体がヒトc-erbB

-2抗体であり、他方がヒトリンパ球抗体であることを特徴とするBFA、殊に標的細胞の表面抗原を認識する抗体が抗ヒトc-erbB-2抗体であって、エフェクター細胞に結合してシグナル伝達を行なう抗体が抗ヒトリンパ球抗体である上記BFA、抗ヒトc-erbB-2抗体がGDF-OA-p185-1である上記BFA、及び上記抗ヒトリンパ球抗体が抗CD3抗体である、ヒトc-erbB-2関連蛋白に特異的に反応する上記BFAが提供される。また、本発明によれば、上記BFAを必須成分とすることを特徴とする癌治療剤が提供される。

【0015】本発明抗体は、抗原(標的細胞及びエフェクター細胞)に対する特異的結合力が強く、またその利用によって、CTL等のエフェクター細胞の有する標的細胞に対する細胞傷害活性を活性化乃至増強させ得る特徴を有しているが、該エフェクター細胞が正常細胞にまで攻撃するような活性化は行なうことなく、更にFcレセプターを介したADCC等による悪影響の可能性をも回避されている。従って本発明抗体は、殊に悪性腫瘍等の臨床治療に有効である。

【0016】以下、本発明抗体、殊に一方の抗体が抗ヒトc-erbB-2抗体のFab'部分であり、他方の抗体が抗ヒトリンパ球抗体のFab'部分であり、之等が結合した本発明抗体の作製法につき詳述する。

【0017】本発明抗体の作製のための材料とする抗体、即ちモノクローナル抗体としては、例えば抗c-erbB-2抗体等の抗体乃至抗腫瘍抗体、及び抗CD3抗体等の抗ヒトリンパ球抗体をそれぞれ利用できる。上記抗c-erbB-2抗体に属する抗c-erbB-2抗体は癌細胞表面に発現しているc-erbB-2遺伝子産物を認識するものであり、これにはGDF-OA-p185-1[Alper,O.,et al., Cell Growth & Differentiation, 1, 591-599 (1990)]、遺伝子組換え技術を用いてヒトc-erbB-2遺伝子を適当な発現ベクターに組込んで得られる組換えDNAを適当な動物細胞に導入し、その動物細胞を形質転換し、ヒトc-erbB-2遺伝子を発現している細胞を選択し、その細胞表面に発現している細胞をc-erbB-2モノクローナル抗体作製のための免疫抗原として作製したSV2-61抗体やSV2-61 γ 抗体(特開平2-150293号公報)、TA b 251抗体、TA b 255抗体、TA b 256抗体、TA b 258抗体、TA b 259抗体(PCR特許W091-02062号公報)、9G6抗体[Van de Vijver M.J., et al., New Eng.J.Med., 31, 1239 (1988)]等が含まれる。

【0018】更に上記抗ヒトリンパ球抗体に属する抗CD3抗体の具体例としては、UCHT1抗体[抗CD3 ϵ 抗体:マウスIgG₁:Beverley,P.C.L. and Callard,R.E., Eur.J.Immunol., 11, 329-334 (1981):インベリアル・キャンサー・リサーチファンデーション(Imper

ial Cancer Research Foundation,UK)], OKT3抗体[抗CD3抗体:マウスIgG_{2a}:Kung,P.C., et al., Science, 206, 347-349 (1979)]等を例示できる。該UCHT1抗体はTリンパ球の細胞表面に発現したヒトCD3 ϵ 抗原を認識する抗体であることが知られている。【0019】之等各抗体はそれぞれのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを新たに作製するか又は既知のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを利用して、公知の方法[例えばKoehler,G. and C.Milstein, Nature, 256, 495 (1975)等参照]に従い製造することができる。その一般的方法としては、まずモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを適当な培養用培地、例えば10%FCS(牛胎児血清)を含むRPMI-1640培地(日本製薬社製)等を用いて培養する。この培養ハイブリドーマをPBS(リン酸緩衝食塩水)又はFCSを含まないRPMI-1640培地に懸濁させ、該懸濁液を、予めブリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン)を腹腔内投与して飼育されたBALB/cヌードマウスに腹腔内投与する。上記投与の約7~14日後にマウス腹部が膨れてきた時点で、該マウスの腹腔より腹水を抜き、次いで該腹水を遠心分離して細胞を除き腹水を得る。この腹水から一般的方法、例えばプロティンA[Forsgren,A. and J.Sjoequist, J.Immunol., 97, 822 (1966)]を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を行なうことにより、目的のモノクローナル抗体を採取、精製することができる。上記精製は、より詳しくは1ml当りの腹水に2~4mlの結合バッファー(1.5Mグリシン、3M NaCl、pH8.9)を加えた混合液を、例えばプロティンAセファロイン(チッソ株式会社製)カラムにアブライし、抗体をカラムに吸着させた後、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH3.0~5.0)で溶出させることにより実施できる。

【0020】上記の如くして得られるモノクローナル抗体からのF(ab')₂の調製は、既に報告されている方法[例えばParham,P., J.Immunol., 131, 2895-2902 (1983)]に準じて、ペプシン消化させることにより行なうことができる。この調製の具体的一例としては、以下の方法を例示することができる。即ち、まず5~10mgの抗体を含む0.1Mクエン酸ナトリウム溶液(pH4.1~4.5)に、抗体の1/10~1/100倍重量のペプシン(シグマ社製)を加えて混合し、37℃の恒温槽で1~8時間消化反応を行なう。該反応液に1Mトリス溶液を加えてpHを8.0として反応を停止させ、20mMトリス塩酸、2mM EDTA及び150mM NaClからなる溶液(pH8.0:以後「TES緩衝液」という)で平衡化したTSK-SW-G3000(トソー社製)カラムを用いてゲル濾過を行ない、最初のピークをブールする。次に、この反応液に2~4倍容量の結合バッファーを加えてプロティンAカラムにアブライして素通り画分を回収し、ペプシン未消化

の完全な抗体分子をカラムに吸着させて除去する。かくして得られた素通り画分を、分子量10000の膜を用いて限外濾過を行なうことにより、濃縮F(ab')₂画分が得られる。抗体により収量は異なるが、通常10mgの抗体から約4~6mg程度のF(ab')₂が得られる。

【0021】上記の如くして得られるF(ab')₂、フラグメントを用いて本発明抗体、即ち上記標的細胞に対する抗体のFab' [モノマー]とエフェクター細胞に対する抗体のFab' [モノマー]とが結合したBFA 10は、例えば新田らの方法[Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989)]に従って作製することができる。

【0022】上記方法は、まず標的細胞の表面抗原を認識する抗体、例えば抗c-erbB-2抗体のF(ab')₂、フラグメントを含むTES緩衝液に、最終濃度が1~2mMとなるようにDTT(和光純薬社製)水溶液を加えて、pH7.5で室温にて30分間反応を行なった後、最終濃度が5mMとなるようにDTNB(和光純薬社製)水溶液を加えて、更に室温で30分間反応を行なわせ、この反応液をTES緩衝液で平衡化したセファデックスG25カラム(ファルマシア社製)を用いてゲル濾過を行なうことにより実施され、かくして標的細胞に対する抗体Fab'-SNBを収得できる。別に、エフェクター細胞に結合し且つシグナル伝達を行なう抗体、例えば抗CD3抗体のF(ab')₂、フラグメントを含むTES緩衝液に、最終濃度が1~2mMとなるようにDTT水溶液を加えて、pH7.5で室温にて30分間反応を行ない、得られる反応液をTES緩衝液で平衡化したセファデックスG25カラムを用いてゲル濾過を行なうことにより、エフェクター細胞に対する抗体Fab'-SHを収得できる。上記で得られるFab'-SHを含むTES緩衝液に、先に得られた標的細胞を認識する抗体のFab'-SNBをほぼ1:1のモル比で加えて、限外濾過膜で濃縮した後、室温で4時間程度反応させることにより、標的細胞に対する抗体のFab' [モノマー]とエフェクター細胞に対する抗体Fab' [モノマー]とが結合した所望のBFAを収得できる。

【0023】上記においては、また抗体Fab'-SNBの作製をエフェクター細胞に対する抗体につき行ない、また抗体Fab'-SHの作製を標的細胞に対する抗体につき行なうこともでき、これによっても所望のBFAを収得することができる。

【0024】かくして得られたBFAをTSK-ゲルG3000SW(トソー社製)を使用するHPLC(高速液体クロマトグラフィー)に付すことにより、未反応のFab'-チオール誘導体(分子量約55kd)を分離して、分子量約110kdを持つBFAを精製することができる。

【0025】非還元条件下で、0.1%SDS(ドデシ 50

ル硫酸ナトリウム:シグマ社製)の存在下にて、7.5%PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)分析を行なうことにより、上記で精製されたBFAが予想された分子量を持っていることの確認を行なうことができる。

【0026】また、上記方法に従って標的細胞に対する抗体のF(ab')₂、[ポリマー]とエフェクター細胞に対する抗体F(ab')₂、[ポリマー]とが結合したBFAを作製することが可能である。該F(ab')₂、[ポリマー]とF(ab')₂、[ポリマー]とが結合したBFAを作製する方法については、本発明者らが先に出版した複合抗体の製造法に記載されている(特願平3-229835号参照)。該方法に従って標的細胞に対する抗体を複数とする(F(ab')₂、[ポリマー]利用)とすることによって、得られるBFAは、その標的細胞に対する結合性がより高められ、これによって本発明所望の治療効果が一層増強され得ると考えられる。

【0027】上記如くして得られる本発明のBFAの利用によれば、CTL等のエフェクター細胞の標的細胞に対する傷害活性を高めることができる。例えば、抗c-erbB-2抗体と抗CD3抗体とを用いて作製した本発明BFAを用いれば、c-erbB-2遺伝子産物を細胞表面に発現している癌細胞を効果的に傷害乃至壊死させることができる。之等の事実は、後記する試験例に示すように、既に報告された試験方法[Staerz, U.D. J. W. Yewdell and M. J. Bevan, Eur. J. Immunol., 17, 571-574 (1987); Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989)]に従う試験により確認できる。

【0028】尚、上記においては、エフェクター細胞として組織適合性抗原型の一一致したリンパ球を用いねばならないという拘束性もなく、例えばクローン化したCTL等を用いることができ、また健康人の末梢血リンパ球(PBL: peripheral blood lymphocyte)を用いてもよく、更にクローン化CTL乃至PBLをインターロイキン-2等の存在下で3日以上培養してLAK(lymphokine activated killer cells)を誘導して用いてもよい。健康人の末梢血リンパ球の調製は、比重分離法に従って以下の如くして行なうことができる。即ち、まずヘパリン採血した健康人の血液10mlに2~3倍重量のPBS緩衝液を加えて混合する。別に、この希釈血液の半量の比重分離液(例えばフィコールバック:ファルマシア社製を用いることができる)を加えた遠沈管に希釈血液の全量を重層した後、400×g、室温で30~40分間密度勾配遠心分離を行ない、遠心後に遠沈管の血漿と比重分離液との間にできる白濁層を吸い取り、10%FCS含有RPMI-1640培地により洗浄する。かくして末梢血リンパ球1~2×10⁷個を得ることができる。またLAKは得られたPBLを10⁶個/mlとなるように10%FCS含有RPMI-1640培地に懸濁し、培地1ml当り10~1000単位のインターロイキ

シー2を加えて培養することにより誘導することができる。

【0029】また放射性同位元素 ^{51}Cr を含むクロム酸ナトリウム(Na_2CrO_4)による標的細胞の標識は、まず標的細胞のベレット($1\sim 2\times 10^6$ 細胞)に、 3.7MBq/ml の上記クロム酸ナトリウム(NE N社製、第一化学製品社販売)を加え、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 存在下で60~90分間培養を行ない、次いで培養後に $10\%\text{FCS}$ 含有RPMI-1640培地を用いて十分に洗浄し、過剰の未反応のクロミウム(^{51}Cr)を除くことにより行なうことができる。かくしてクロミウム(^{51}Cr)標識標的細胞を取得できる。

【0030】上記クロミウム(^{51}Cr)標識標的細胞、エフェクター細胞及びハイブリッド抗体を用いた細胞傷害試験は、より詳しくは、まず適当な濃度(通常 $0.01\sim 3\mu\text{g/ml}$)に希釈したBFAの $100\mu\text{l}$ とエフ*

$$\text{特異的傷害\%} = [(a-b)/(c-d)] \times 100 \quad (1)$$

[aはBFAを介したエフェクター細胞による標的細胞の特異的 ^{51}Cr 放出を示す実測値を、bは標的細胞のみを培養した時のウェル中の放射能活性(自然放出)を、cは $1\%\text{NP-40}$ (シグマ社製)溶液を用いて標的細胞を溶解させた時の反応液中の放射活性(最大放出)をそれぞれ示す。]

上記細胞傷害試験によれば、本発明BFA、特に抗c-erbB-2抗体のFab'と抗CD3抗体のFab'を用いて作製した本発明BFAは、 100ng/ml の用量で約25%の特異的標的細胞傷害が観察され、このことから高い標的細胞傷害能を有することが確認された(後記する図1-A参照)。これに対して、抗c-erbB-2抗体のFab'、フラグメントと抗CD3抗体のFab'、フラグメントとを1:1の比率で単に混合した混合液では、 1000ng/ml まで濃度を上げてても有意な細胞傷害性は認められなかった(後記する図1-B参照)。また、各親のFab'、フラグメントも 1000ng/ml まで濃度を上げてても有意な細胞傷害性は認められなかった。

【0032】このように、標的細胞に対する抗体のFab'フラグメントとエフェクター細胞に対する抗体のFab'フラグメントとが結合した本発明のBFAは、これが 10ng/ml という極微量から標的細胞の特異的細胞傷害活性を示す(後記する図1-A参照)ことから、c-erbB-2遺伝子産物を細胞表面に発現している癌細胞による悪性腫瘍の治療剤、特に乳癌治療剤として有用である。

【0033】また本発明BFAは、その標的細胞に対する高い結合力維持性を応用して、上記治療剤の他にも、例えば従来のモノクローナル抗体に代わって、各種の診断薬として利用できる。

【0034】以上のように、本発明抗体は悪性腫瘍治療剤として有効であり、従って本発明にかかる悪性腫瘍治

剤をも提供するものである。この本発明悪性腫瘍治療剤は、上記BFAをその必須成分として含有することを基本として、他は通常の製剤技術乃至この種BFAを用いる免疫療法等で慣用されている技術手段に従い調製することができる。即ち、該治療剤は通常本発明抗体と共に適当な医薬製剤担体を配合して製剤組成物の形態に調製される。用いられる担体としては使用形態に応じた製剤の調製に通常慣用される各種のもの、例えば充填剤、増量剤、結合剤、表面活性剤、緩衝液、安定化剤等の賦形剤乃至希釈剤のいずれでもよく、調製される製剤形態は、これが本発明治療剤成分を効果的に含有する状態であればよく、例えば錠剤、粉末剤等の固剤であってもよいが、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の注射剤形態とするのがよい。またこれは使用前に適当な担体の添加により液状となし得る乾燥品の形態とすることもでき、いずれの形態も常法に従い調製できる。また各形態の製剤はその形態に応じて適当な投与経路、例えば注射剤形態の製剤では静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与され、固型形態の製剤は経口乃至経腸投与される。勿論、予め体外でリンパ球等に本発明抗体を反応させてから、それを静脈内、腹腔内、感染病巣等に投与することも有用な方法である。

【0031】は、次の計算式(1)に従って求めることができる。

【0031】

療剤をも提供するものである。この本発明悪性腫瘍治療剤は、上記BFAをその必須成分として含有することを基本として、他は通常の製剤技術乃至この種BFAを用いる免疫療法等で慣用されている技術手段に従い調製することができる。即ち、該治療剤は通常本発明抗体と共に適当な医薬製剤担体を配合して製剤組成物の形態に調製される。用いられる担体としては使用形態に応じた製剤の調製に通常慣用される各種のもの、例えば充填剤、増量剤、結合剤、表面活性剤、緩衝液、安定化剤等の賦形剤乃至希釈剤のいずれでもよく、調製される製剤形態は、これが本発明治療剤成分を効果的に含有する状態であればよく、例えば錠剤、粉末剤等の固剤であってもよいが、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の注射剤形態とするのがよい。またこれは使用前に適当な担体の添加により液状となし得る乾燥品の形態とすることもでき、いずれの形態も常法に従い調製できる。また各形態の製剤はその形態に応じて適当な投与経路、例えば注射剤形態の製剤では静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与され、固型形態の製剤は経口乃至経腸投与される。勿論、予め体外でリンパ球等に本発明抗体を反応させてから、それを静脈内、腹腔内、感染病巣等に投与することも有用な方法である。

【0035】本発明治療剤の投与量は該製剤の投与方法、投与形態、使用目的、適用患者等に応じて適宜決定され一定ではないが、一般には本発明抗体の量が約0.00001~80重量%程度含有されるものとするのがよく、この製剤は一日成人一人当たり約 $0.01\mu\text{g}\sim 10\text{mg}$ 程度の範囲で適用されるのが好ましい。かくして本発明治療剤の投与によれば、これを投与された患者の体内においてリンパ球の細胞傷害性が増強され、かくして所望の治療効果が奏される。

【0036】また、本発明治療剤を用いた免疫療法の内、養子免疫療法、即ち一度患者生体より採取したリン

パ球を何等かの手段で活性化した後、再度患者生体内に戻して治療を行なう方法は、例えば次の如くして実施できる。即ち、患者の末梢血約100mlからリンパ球を分離し、1L-2約100U/mlを添加した無血清培地で約1週間程度培養し、得られるLAK細胞（リンホカイン活性化キラー細胞）約 1×10^8 個を本発明のBFA約100~1000 μ g、好ましくは約100 μ g前後と共に患者体内に注入することにより実施され、この処置は患者の病状、年齢等に応じて通常週に数回に分けて行なうことができる。

【0037】

【発明の効果】本発明抗体は、抗原（標的細胞及びエフェクター細胞）に対する特異的結合力が強く、その利用によりCTL等のエフェクター細胞の有する標的細胞に対する細胞傷害活性を活性化乃至増強させ得る特徴を有している。

【0038】

【実施例】以下、本発明BFA及びこれを用いた悪性腫瘍治療剤につきより詳細に説明するため、実施例を挙げる本発明はこれに限定されない。

【0039】

【実施例1】BFAの製造

1) UCHT1腹水の調製

UCHT1細胞【抗CD3 ϵ 抗体：マウスIgG、:Beverley, P.C.L. and Callard, R.E., Eur. J. Immunol., 11, 329-334 (1981): インベリアル・キャンサー・リサーチファンデーション(Imperial Cancer Research Foundation, UK)より入手】を10%FCS（フロー社製）を含むRPMI-1640培地（日水製薬社製）を用いて、37℃、5%CO₂存在下で培養してハイブリドーマを得た。

【0040】別にBALB/c（日本チャールズリバー社製）の腹腔内に、一匹当たり0.5mlのプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン、和光純薬社製）を投与して1~2週間飼育を行なった。

【0041】次に先に得られたUCHT1細胞を、PBSに懸濁し、その 1×10^7 細胞/0.5mlずつを各マウス腹腔内に投与した。上記投与の2~3週間目にマウスの腹腔が膨れてきた時点で、マウスの腹腔より腹水を抜き、該腹水を日立遠心機05PR-22（日立製作所社製）を用いて10000rpm、30分間、4℃で遠心分離し、UCHT1抗体を含む腹水上清を得た。

【0042】2) UCHT1-F(ab')₂、フラグメントの調製

上記1)で得られたUCHT1腹水上清に2倍容量の1.5Mグリシン及び3M NaClからなる緩衝液（pH8.9）を加えて混合し、混合液を、固定化プロテインA（Immobilized-Protein A (Repligen社)）カラムにアブライし、UCHT1抗体をカラムに吸着させた。十分に1.5Mグリシン及び3M NaClからな

る緩衝液（pH8.9）で洗浄した後、吸着しているUCHT1抗体を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH3.0~5.0）で溶出させて、IgG溶液を得た。

【0043】上記で得られたIgG溶液2ml（IgG10mg）を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.1）に対して4℃で一晩透析した。透析液を回収後、これに抗体の1/10~1/25量（w/w）のペプシン（シグマ社製）を加えて混合し、37℃の恒温槽で6~8時間消化反応を行なった。反応後、反応液に1Mトリス溶液1/2容量を加えて反応を停止させ、150mM NaCl含有20mMリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したTSK-G3000SW（トソー社製）カラム（21.5mmID×60cm）を用いてゲル濾過を行ない、F(ab')₂画分をブールした。

【0044】次に、この分取した画分に1.5Mグリシン及び3M NaClからなる緩衝液（pH8.9）を加え、その混合液をプロテインAカラムにアブライして素通り画分を回収し、カラムにペプシン未消化のUCHL1抗体を吸着させて除去した。かくして得られた素通りの画部を、分子量10000の膜を用いて限外濾過（アミコン社製、ダイアフローメンブレンYM10、43mm膜を使用）を行ない、バッファーを20mMトリス塩酸、2mM EDTA及び150mM NaClからなる溶液（pH8.0：以後「TES緩衝液」という）に交換して、UCHT1のF(ab')₂、フラグメントの4mgを得た。

【0045】3) GFD-OA-p185-1腹水の調製

まずヒトc-erbB-2遺伝子産物を認識する抗体としてのGFD-OA-p185-1抗体を以下のように調製した。即ち、GFD-OA-p185-1抗体を産生するハイブリドーマGFD-OA-p185-1（微生物菌第12206号）を上記1)と同様にして培養した後、該細胞をマウスの腹腔内に投与し、該腹水よりGFD-OA-p185-1抗体を含む腹水上清を得た。

【0046】4) GFD-OA-p185-1-F(ab')₂、フラグメントの調製

上記2)と同様にして3)で得られたGFD-OA-p185-1腹水上清に2倍容量の1.5Mグリシン及び3M NaClからなる緩衝液（pH8.9）を加えた混合液を、プロテインAカラムにアブライし、GFD-OA-p185-1抗体をカラム吸着させた。同バッファーで洗浄した後、吸着しているGFD-OA-p185-1抗体を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH3.0~5.0）で溶出させて、IgGを含む溶液を得た。

【0047】上記で得られたIgGを含む溶液2ml（IgG10mg）を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩

10

20

30

40

50

衡液 (pH 4.1) に対して 4℃ で一晚透析した。透析液を回収後、これに抗体の 1/10 ~ 1/25 量 (w/w) のペプシンを加えて混合し、37℃ の恒温槽で 4 ~ 8 時間消化反応を行なった。反応後、反応液に 1M トリス溶液 1/2 容量を加えて反応を停止させ、150 mM NaCl 含有 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した TSK-G3000SW カラムを用いてゲル濾過を行ない、F(ab')₂ を画分をブールした。

【0048】次に、この画分に 1.5 M グリシン及び 3 M NaCl からなる緩衝液 (pH 8.9) を加え、その混合液をプロテイン A カラムにアプライして素通り画分を回収し、カラムにペプシン未消化の GFD-OA-p185-1 抗体を吸着させて除去した。かくして得られた素通りの画分を、分子量 10000 の膜を用いて限外濾過を行ない、バッファーを TES 緩衝液に交換して、GFD-OA-p185-1 の F(ab')₂、フラグメント 5 mg を得た。

【0049】5) GFD-OA-p185-1 Fab' と UCHT1-Fab' との BFA の作製

上記 4) で調製した GFD-OA-p185-1 抗体の F(ab')₂、フラグメント 3 mg を含む 1.0 ml TES 緩衝液に、20 μl の 100 mM ジチオスレイトール (DTT; 和光純薬社製) 水溶液を加えて、pH 7.5、室温にて 30 分間反応を行なった後、引き続き 10 mM DTNB 水溶液 (和光純薬社製) 1 ~ 2 倍量を加えて、更に室温で 30 分間反応を行なわせた。この反応液を窒素ガスで置換した TES 緩衝液で平衡化したセファデックス G25 カラムを用いてゲル濾過し、最初のピークをブールして、GFD-OA-p185-1-Fab' の混合ニトロフェニルジスルフィド誘導体 (GFD-OA-p185-1-Fab'-SNB) を収得した。

【0050】別に、上記 2) で調製した UCHT1 抗体の F(ab')₂、フラグメント 3 mg を含む 1.0 ml TES 緩衝液に、20 μl の DTT 水溶液を加えて、pH 7.5 で室温にて 30 分間反応を行なった後、得られた反応液を窒素ガスで置換した TES 緩衝液で平衡化したセファデックス G25 カラムを用いてゲル濾過し、最初のピークをブールして、UCHT1-Fab'-SH を収得した。

【0051】上記 UCHT1-Fab'-SH に、先に調製した GFD-OA-p185-1-Fab'-SNB を加え、限外濾過膜 (YM10) で濃縮後、室温で 4 時間反応させ、以後、4℃ で反応を継続させることによって、GFD-OA-p185-1-Fab' と UCHT1-Fab' のモノマー同士が結合した BFA を得た。

【0052】上記で得られた BFA を含む TES 緩衝液を TSK ゲル G3000SW (トソー社製) を使用した HPLC (高速液体クロマトグラフィー) 又はイオン

交換クロマトグラフィーやハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーに付すことにより未反応の Fab'-チオール誘導体 (分子量約 55 kd) から目的の BFA を分離して精製した。

【0053】精製した BFA を非還元条件下で、0.1 % SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、シグマ社製) 存在下に、7.5 % PAGE 分析を行ない、精製した BFA の分子量を確認した。

【0054】上記 SDS-PAGE の結果、分子量約 110 kd の位置にバンドを確認し、このことから BFA は予想した分子量約 110 kd をもつことが確認された。

【0055】

【実施例 2】実施例 1 で得られた本発明 BFA と GFD-OA-p185-1-F(ab')₂、フラグメント及び UCHT1-F(ab')₂、フラグメントとの免疫学的反応性を、7 つのヒト癌細胞株と健常ヒトボランティアから調製した末梢血リンパ球 (PBL) を使用して以下の通り試験した。

【0056】この試験には、以下に示す 7 つのヒト癌細胞株 (いずれもアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ATCC; Rockville, Md. U.S.A. より入手) を用いた。

【0057】ZR-75-1 (ヒト乳癌細胞株: ATCC CRL1500)

SK-BR-3 (ヒト乳癌細胞株: ATCC HTB30)

MCF-7 (ヒト乳癌細胞株: ATCC HTB22)

PANC-1 (ヒト膵臓、上皮腺癌細胞株: ATCC CRL1469)

MIAPaCa-2 (ヒト膵臓癌細胞株: ATCC CRL1420)

ASPC-1 (ヒト転移性膵臓癌細胞株: ATCC CRL1682)

BxPC-3 (原発性ヒト膵臓癌細胞株: ATCC CRL1687)

上記 7 つのヒト癌細胞株と健常ボランティアの PBL を、それぞれ 0.1 % BSA 及び 0.1 % NaN₃ を含む PBS 緩衝液で洗浄した後、同 PBS 緩衝液中に 10 μg の各抗体を加え、氷上に 30 分間反応させた。反応後、細胞を 2 回洗浄し、次いで FITC-複合抗マウス IgG (Tago Inc., U.S.A. 社製) を加え、更に氷上に 30 分間反応させた。反応後、2 回洗浄し、次いで各抗体の反応活性をオルト・スペクトラム III (Ortho Diagnostic Inc., U.S.A. 社製) を使用したフロー・サイトメトリーによって測定した。尚、陽性細胞は対数表示蛍光強度を所有しているものとして定量した。

【0058】その結果を第 1 表に示す。

【0059】

【表1】

第 1 表

細胞	対 照 ^{a)}	F (a b') 2 フラグメント		
		抗 c - e r b B - 2 遺伝子産物	抗 CD 3	B F A
P B L	2. 7 ^{b)}	4. 9	8 2. 7	8 2. 8
Z R - 7 5 - 1	8. 2	8 5. 5	2. 6	9 2. 9
S K - B R - 3	2. 0	9 9. 5	2. 9	9 9. 9
M C F 7	4. 8	4 0. 3	1. 9	4 7. 4
P A N C - 1	4. 6	2 4. 4	3. 6	2 5. 9
M I A P a C a - 2	2. 2	6 1. 4	5. 2	6 1. 9
A s P C - 1	9. 6	3 3. 5	N T	2 2. 1
B x P C - 3	2. 8	8. 8	2. 4	8. 6

a) : 第2抗体のみ

b) : 各抗体と反応した細胞%

【0060】該表中、数字は各抗体と反応した多彩防のパーセント(%)を示す。またコントロール(対照)は第2抗体のみを表わし、NTは未試験を示す。

【0061】該表より、抗c-e r b B-2遺伝子産物 F (a b')₂ フラグメントは、2つの乳癌細胞株 Z R - 7 5 - 1 及び S K - B R - 3 に対して強く反応した。之等の2つの癌細胞株は、豊富にc-e r b B-2 mRNAを発現することが知られている癌細胞株である [Kraus, M.H., et al., EMBO J., 6, 605-610 (1987)]。またこの F (a b')₂ フラグメントは、癌細胞株 M C F - 7、P A N C - 1、M I A P a C a - 2 及び A S P C - 1 と弱い反応性(前の2つの癌細胞株に比較して)を示し、癌細胞株 B x P C - 3 に対してはほとんど反応性を示さなかった。更に、P B L とは反応しなかった。

【0062】抗CD3ε F (a b')₂ フラグメントは、P B L にのみ反応し、癌細胞株とは反応しなかった。本発明BFAは、2つのヒト乳癌細胞株 Z R - 7 5 - 1 及び S K - B R - 3 と P B L に対して強く反応した。また該BFAの反応活性は、他のヒト癌細胞株に対しては上記抗c-e r b B-2遺伝子産物 F (a b')₂ フラグメントと同様であった。

【0063】之等の試験結果から、本発明のBFAは期待された免疫学的特徴を保有するものであることが明らかとなった。

【0064】

【実施例3】実施例1で得られた本発明BFAの細胞傷害活性測定を、エフェクター細胞としてPBLを、標的細胞としてZ R - 7 5 - 1 及び S K - B R - 3 をそれぞれ使用して、BFAを介して之等各エフェクター細胞と標的細胞とが結合した時に起こる標的細胞の特異的な溶解を指標として、以下の方法に従い実施した。

【0065】① 標的細胞の⁵¹Crによる標識

10%FCSを含むRPMI-1640培地を用いて、Z R - 7 5 - 1 細胞及びS K - B R - 3 細胞を、37℃で5%CO₂存在下で培養した。次に、培養上清を除去し、PBS(-) 25mlで洗浄後、それぞれの培養細胞に0.05%トリプシン-0.05%EDTA-PBS溶液2.5mlを加え、37℃で1分間インキュベートして、細胞を剥がし、10%FCS含有RPMI-1640培地20mlに懸濁させて中和し、1000rpm、8分間室温で2回同培地で遠心洗浄した。

【0066】次いで、得られた各細胞の沈殿(5×10⁶細胞)に3.7MBqのクロム酸ナトリウム(Na₂⁵¹CrO₄; NEN社製)を加え、37℃で5%CO₂存在下で60分間培養を行ない、培養液を10%FCS含有RPMI-1640培地を用いて2回洗浄して過剰のクロム酸ナトリウムを除去し、血球計算盤で細胞数を数えた後、培養液の濃度が2×10⁵細胞/mlとなる

ように10%FCS含有RPMI-1640培地にて希釈した。

【0067】② エフェクター細胞(PBL)の調製
へパリン採血した健康人血液50mlにPBS緩衝液50mlを加えて混合し、別に50mlの遠心管4本に比重分離液(リンボサイトセパレーションメディウム:フロー(Flow Laboratories)社製)を15mlずつ加えておき、先の血液25mlずつを之等各管に重層した。その後、日立遠心機O5PR-22を用いて1500rpm、30分間、室温にて密度勾配遠心分離を行なった。

【0068】遠心後に4本の遠心管中の血漿と比重分離液との間にできる白濁層をパスツールピペットを用いて吸い取り、これを新しい50mlの遠心管に移し、25mlの10%FCS含有RPMI-1640培地を加えて混合し、1000rpm、5分間遠心してPBLを沈殿として回収した。10%FCS含有RPMI-1640培地による洗浄操作を3回繰り返した後、得られた沈殿を10%FCS含有RPMI-1640培地に懸濁させた。

【0069】③ 各抗体の調製

実施例1で得られた本発明のGFD-OA-p185-1-Fab'-UCHT1-Fab'結合型BFA、このBFA作製の出発材料として用いたGFD-OA-p185-1-F(ab')₂、フラグメントとUCHT1-F(ab')₂、フラグメントとの1:1混合物、GFD-OA-p185-1-F(ab')₂、フラグメント及びUCHT1-F(ab')₂、フラグメントのそれぞれを、10%FCS含有RPMI-1640培地を用いて、それぞれをマイレックスGVフィルター0.22μm(日本ミリポアー社製)を用いて無菌濾過した後、20ng/ml、200ng/ml及び2000ng/mlの各濃度に希釈調製した。

【0070】④ 細胞傷害活性試験

上記③で調製した各種濃度の抗体100μl及びエフェクター細胞50μl(細胞数=5×10⁴個、Effector;E)と、標的細胞の50μl(1×10⁴個、Target;T)とを、それぞれ96穴U底培養プレート(ファルコン(Falcon)社製)の各ウェルに添加(Effector/Target=E/T=5)し、37℃、5%CO₂存在下で4時間培養して、標的細胞の特異的傷害反応を行なわせた。次に、培養上清をスーパーネータント・コレクション・システム(大日本製薬社製)で採取し、測定チューブに入れ、該チューブ内に含まれる放射能活性をカウントした。また、上記と同様な条件でそれぞれの抗体を、エフェクター細胞と標的細胞の比率(E/T)を0、10及び2.0に代えて、反応させた。

【0071】各抗体を介してエフェクター細胞と標的細胞とを結合させた時に起こる標的細胞の特異的傷害活性

の程度(%)を、前記計算式(1)に従って求めた。

【0072】得られた結果を図1及び図2に示す。

【0073】図1はZR-75-1細胞に対して本発明BFAを用いた結果を示しており、図2はZR-75-1細胞に対してGFD-OA-p185-1-F(ab')₂、フラグメントとUCHT1-F(ab')₂、フラグメントとの1:1混合物を用いた場合の結果を示している。

【0074】各図において横軸は用いた抗体の絶対量(ng/ml)を、縦軸は標的細胞の特異的傷害(% Specific Cytotoxicity)を示し、図中(1)はE/T=0の場合を、(2)はE/T=5の場合を、(3)はE/T=10の場合を、また(4)はE/T=20の場合を、それぞれ示す。

【0075】上記図1より、PBLと結合した本発明のBFAはZR-75-1細胞のケースにおいて、有意な細胞傷害活性を保有することが確認された。この細胞傷害活性の発現に必要なBFAの濃度は、10ng/ml以上であり、またE/T比は5以上であった。また、本発明BFAは100ng/mlの用量で且つE/T比が20で最大約25%の特異的標的細胞傷害が観察でき、このことから高い標的細胞傷害活性を有することが確認された。これに対して、GFD-OA-p185-1-F(ab')₂、フラグメントとUCHT1-F(ab')₂、フラグメントとの1:1混合物を用いた場合は、1000ng/mlまで濃度を上げて有意な細胞傷害活性は認められなかった(図2参照)。

【0076】更に、GFD-OA-p185-1-F(ab')₂、フラグメント及びUCHT1-F(ab')₂、フラグメントのそれぞれを用いて同一試験を行なった結果、之等の各フラグメントは1000ng/mlまで濃度を上げて有意な細胞傷害活性は認められなかった。

【0077】以上の結果より、本発明BFAは10ng/mlという極微量から標的細胞の特異的細胞傷害活性を示し、このことからc-erbB-2遺伝子産物を細胞表面に発現している癌細胞よりなる悪性腫瘍の治療剤、特に乳癌治療剤として有用であることが分かる。

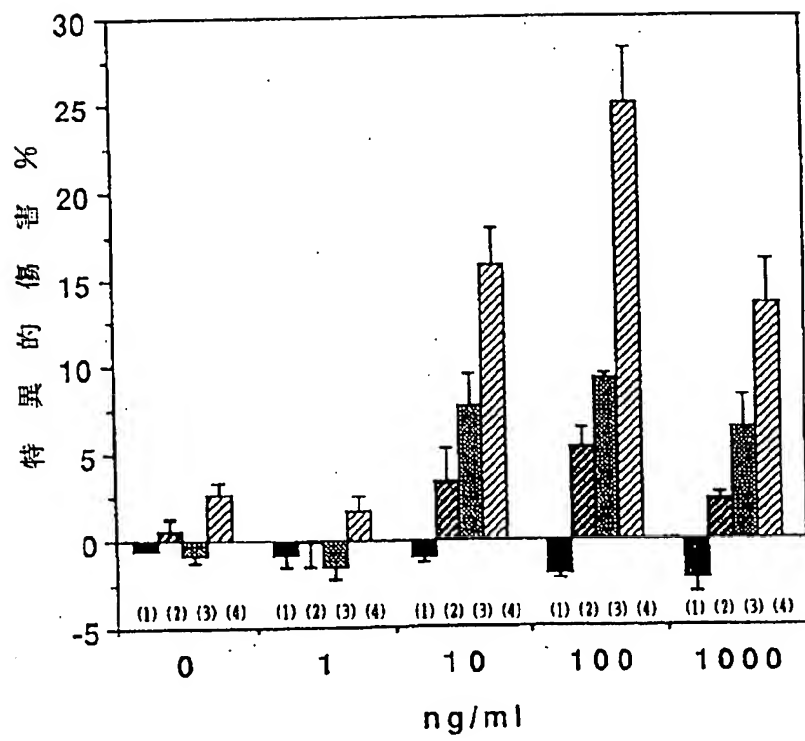
【0078】また本発明BFAの標的細胞に対する高い結合力維持性を応用すれば、本発明所望の上記治療剤の他にも、例えば従来のモノクローナル抗体に代わって、各種の診断薬としての利用も期待できる。

【図面の簡単な説明】

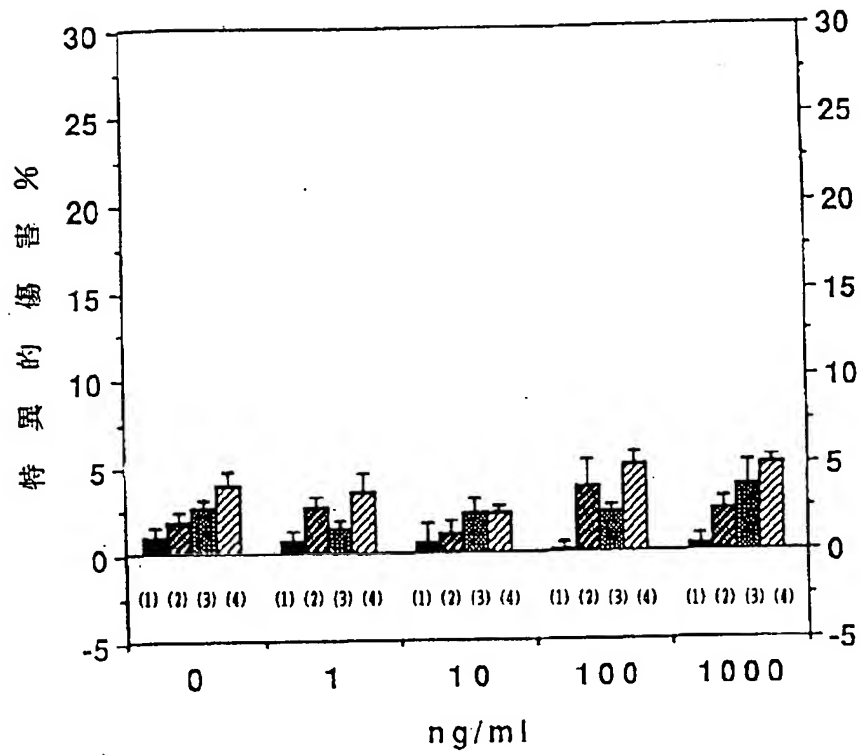
【図1】本発明BFAの細胞傷害活性を調べたグラフである。

【図2】図1と対比して対照とする抗体混合物の細胞傷害活性を調べたグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 出口 恭平
徳島県徳島市末広4丁目1-9-703号

(72)発明者 今川 健一
徳島県板野郡北島町新喜来字北ハリ1-83
(72)発明者 菊地 幹雄
神奈川県鎌倉市今泉台4-29-14

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成6年(1994)7月5日

【公開番号】特開平5-213775

【公開日】平成5年(1993)8月24日

【年通号数】公開特許公報5-2138

【出願番号】特願平4-19968

【国際特許分類第5版】

A61K 39/395 ADU G 9284-4C

T 9284-4C

Z 9284-4C

C07K 15/28

8517-4H

【手続補正書】

【提出日】平成5年6月29日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正内容】

【0002】

【従来の技術】従来、癌免疫療法においてモノクローナル抗体は抗体依存性細胞性細胞傷害作用(ADCC; antibody-dependent cellular cytotoxicity) [Martin, J. S., et al., Blood, 73, 1431-1439 (1989)] と或いは補体依存性溶菌作用(complement-dependent cytotoxicity) [Irie, R. F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83, 8649-8698 (1986)] に基づく受動免疫により広く臨床試験がなされた。しかしながら、癌治療のために必要な効能のある細胞傷害性免疫反応を誘導するモノクローナル抗体は例外的であった。之等の臨床結果はモノクローナル抗体による癌治療の研究の限界を示すものであった。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】上記c-erbB-2蛋白質に対する抗体やモノクローナル抗体も既に開発され、病理材料のみならず、手術材料を直ちに免疫染色法によって検査する方法も開発されつつあり [Masuko, T., et al., Jpn. J. Cancer Res., 80, 10-14 (1989)] ; Yamada, Y., et al., Jpn. J. Cancer Res., 80, 1192-1198 (1989)]、c-erbB-2遺

伝子産物を認識する抗体としても、例えばc-erbB-2遺伝子のC末端領域を認識するポリクローナル抗体、pAb1 (T4881) [トリトンバイオサイエンス社製 (Triton Bioscience Inc.; Alameda, CA)] やキナーゼドメインを認識するポリクローナル抗体Ab-1 [オンコジーンサイエンス (Oncogene Science Inc.; Manhasset, NY)] や、c-erbB-2の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体、SV2-617 [株式会社ニチレイ (特開平2-150293号公報参照)] 等が知られ、本発明者らも先に腺癌、特に乳癌の診断剤及び治療剤を提供する目的でヒト乳癌細胞株SK-BR-3 (ATCC寄託番号; ATCC HTB30) の培養上清で免疫した哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物の骨髓細胞との融合により形成されたハイブリドーマにより産生され、c-erbB-2関連蛋白質に特異的に反応する抗c-erbB-2モノクローナル抗体、GFD-OA-p185-1を作製した [Ouzge, Alper, et al., Cell Growth & Differentiation, 1, 591-599 (1990)]。上記GFD-OA-p185-1抗体は、c-erbB-2遺伝子を発現するヒト癌細胞株SK-BR-3及び、A-549 (ヒト肺癌細胞株; ATCC CCL185) のインビトロでの増殖を有意に抑制した (特願平3-229835号)。上記各抗体は、c-erbB-2蛋白質とそれぞれ反応し、c-erbB-2遺伝子産物の発現と関連する疾患、特に腺癌、中でも乳癌等の診断に有用であるが (特開平3-191865号公報参照)、これらの抗体は上記悪性腫瘍の治療剤としては、前記したようにモノクローナル抗体であり、必ずしも良好な治療効果が予想されない。本発明者らはより一般的な上皮癌に対するBFAによる免疫治療法を開発するために、c-erbB-2遺伝子産物に関連するものを標的とするBFAを開発し、インビトロにおけるBFAの抗腫瘍活性を評価

し、ここに本発明を完成するに至った。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】また、上記方法に従って標的細胞に対する抗体のF(ab')₂。[ポリマー]とエフェクター細胞に対する抗体F(ab')₂。[ポリマー]とが結合したBFAを作製することが可能である。該F(ab')₂。[ポリマー]とF(ab')₂。[ポリマー]とが結合したBFAを作製する方法については、本発明者らが先に出願した複合抗体の製造法に記載されている（特願平3-229835号参照）。該方法に従って標的細胞に対する腕を複数とする（F(ab')₂。[ポリマー]利用）ことによって、得られるBFAは、その標的細胞に対する結合性がより高められ、これによって本発明所望の治療効果が一層増強され得ると考えられる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正内容】

【0027】上記の如くして得られる本発明のBFAの利用によれば、CTL等のエフェクター細胞の標的細胞に対する傷害活性を高めることができる。例えば、抗c-erbB-2抗体と抗CD3抗体とを用いて作製した本発明BFAを用いれば、c-erbB-2遺伝子産物を細胞表面に発現している癌細胞を効果的に傷害乃至壊死させることができる。之等の事実は、後記する試験例に示すように、既に報告された試験方法〔Staerz, U. D., J. W. Yewdell and M. J. Bevan, Eur. J. Immunol., 17, 571-574 (1987); Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989)〕に従う試験により確認できる。

*

$$\text{特異的傷害\%} = [(a-b)/(c-b)] \times 100 \quad (1)$$

[aはBFAを介したエフェクター細胞による標的細胞の特異的⁵¹Cr放出を示す実測値を、bは標的細胞のみを培養した時のウェル中の放射能活性（自然放出）を、cは1%NP-40（シグマ社製）溶液を用いて標的細胞を溶解させた時の反応液中の放射能活性（最大放出）をそれぞれ示す。] 上記細胞傷害試験によれば、本発明BFA、特に抗c-erbB-2抗体のF(ab')₂と抗CD3抗体のF(ab')₂とを用いて作製した本発明BFAは、100ng/mlの用量で約25%の特異的標的細胞傷害が観察され、このことから高い標的細胞傷害能を有することが確認された（後記する図1-A参照）。これに対して、抗c-erbB-2抗体のF(ab')₂

＊【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】尚、上記においては、エフェクター細胞として組織適合性抗原型の一一致したリンパ球を用いねばならないという拘束性もなく、例えばクローン化したCTL等を用いることができ、また健康人の末梢血リンパ球（PBL: peripheral blood lymphocyte）を用いてもよく、更にクローン化CTL乃至PBLをインターロイキン-2等の存在下で3日以上培養してLAK（lymphokine activated killer cells）を誘導して用いてもよい。健康人の末梢血リンパ球の調製は、比重分離法に従って以下の如くして行なうことができる。即ち、まずヘパリン採血した健康人の血液10mlに2～3倍重量のPBS緩衝液を加えて混合する。別に、この希釈血液の半量の比重分離液（例えばフィコールバック：ファルマシア社製を用いることができる）を加えた遠沈管に希釈血液の全量を重層した後、400×g、室温で30～40分間密度勾配遠心分離を行ない、遠心後に遠沈管の血漿と比重分離液との間にできる白濁層を吸い取り、10%FCS含有RPMI-1640培地により洗浄する。かくして末梢血リンパ球1～2×10⁷個を得ることができる。またLAKは得られたPBLを10⁶個/mlとなるように10%FCS含有RPMI-1640培地に懸濁し、培地1ml当り10～1000単位のインターロイキン-2を加えて培養することにより誘導することができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正内容】

【0031】

2 フラグメントと抗CD3抗体のF(ab')₂フラグメントとを1:1の比率で単に混合した混合液では、1000ng/mlまで濃度を上げてても有意な細胞傷害性は認められなかった（後記する図1-B参照）。また、各親のF(ab')₂フラグメントも1000ng/mlまで濃度を上げてても有意な細胞傷害性は認められなかった。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正内容】

【0039】

【実施例1】BFAの製造

1) UCHT1腹水の調製

UCHT1細胞[抗CD3ε抗体:マウスIgG₁:Beveley, P. C. L. and Callard, R. E., Eur. J. Immunol., 11, 329-334 (1981):インペリアル・キャンサー・リサーチファンデーション(Imperial Cancer Research Foundation, UK)より入手]を10%FCS(フロー社製)を含むRPMI-1640培地(日水製薬社製)を用いて、37℃、5%CO₂存在下で培養してハイブリドーマを得た。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正内容】

【0043】上記で得られたIgG溶液2ml(IgG 10mg)を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH4.1)に対して4℃で一晩透析した。透析液を回収後、これに抗体の1/10~1/25量(w/w)のペプシン(シグマ社製)を加えて混合し、37℃の恒温槽で6~8時間消化反応を行なった。反応後、反応液に1Mトリス溶液1/2容量を加えて反応を停止させ、150mM NaCl含有20mMリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したTSK-G3000SW(トソー社製)カラム(21.5mmID×60cm)を用いてゲル濾過を行ない、F(ab')₂画分をブールした。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正内容】

【0044】次に、この分取した画分に1.5Mグリシン及び3M NaClからなる緩衝液(pH8.9)を加え、その混合液をプロテインAカラムにアプライして素通り画分を回収し、カラムにペプシン未消化のUCHT1抗体を吸着させて除去した。かくして得られた素通りの画部を、分子量10000の膜を用いて限外濾過(アミコン社製、ダイアフローメンブレンYM10、43mm膜を使用)を行ない、バッファーを20mMトリス塩酸、2mM EDTA及び150mM NaClからなる溶液(pH8.0:以後「TES緩衝液」という)に交換して、UCHT1のF(ab')₂フラグメントの4mgを得た。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正内容】

【0045】3) GFD-OA-p185-1腹水の調製

まずヒトc-erbB-2遺伝子産物を認識する抗体としてのGFD-OA-p185-1抗体を以下のように調製した。即ち、GFD-OA-p185-1抗体を産生するハイブリドーマGFD-OA-p185-1(微工研菌寄第12206号)を上記1)を培養した後、該細胞をマウスの腹腔内に投与し、該腹水よりGFD-OA-p185-1抗体を含む腹水上清を得た。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正内容】

【0060】該表中、数字は各抗体と反応した癌細胞のパーセント(%)を示す。またコントロール(対照)は第2抗体のみを表わし、NTは未試験を示す。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正内容】

【0065】① 標的細胞の⁵¹Crによる標識
10%FCSを含むRPMI-1640培地を用いて、ZR-75-1細胞及びSK-BR-3細胞を、37℃で5%CO₂存在下で培養した。次に、培養上清を除去し、PBS(-)25mlで洗浄後、それぞれの培養細胞に0.05%トリプシン-0.05%EDTA-PBS溶液2.5mlを加え、37℃で1分間インキュベートして、細胞を剥がし、10%FCS含有RPMI-1640培地20mlに懸濁し、1000rpm、8分間室温で2回同培地で遠心洗浄した。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正内容】

【0070】② 細胞傷害活性試験

上記③で調製した各種濃度の抗体100μl及びエフェクター細胞50μl(細胞数=5×10⁴個、Effector:E)と、標的細胞の50μl(1×10⁴個、Target:T)とを、それぞれ96穴U底培養プレート(ファルコン(Falcon)社製)の各ウェルに添加(Effector/Target=E/T=5)し、37℃、5%CO₂存在下で4時間培養して、標的細胞の特異的傷害反応を行なわせた。次に、培養上清をスーパーネータント・コレクション・システム(大日本製薬社製)で採取し、測定チューブに入れ、該チューブ内に含まれる放射能活性をカウントした。ま

た、上記と同様な条件でそれぞれの抗体を、エフェクター細胞と標的細胞の比率（E/T）を0、10及び20に代えて、反応させた。